

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

A61K 39 / 395
C07K 16 / 00 C07K 16 / 18
C07K 16 / 28 C07K 16 / 30

[21] 申请号 95193133.4

[43]公开日 1997年6月4日

[11] 公开号 CN 1151120A

[22]申请日 95.3.9

[30]优先权

[32]94.3.18 [33]US[31]08 / 210,715

[32]94.12.30[33]US[31]08 / 366,665

[86]国际申请 PCT / US95 / 03035 95.3.9

[87]国际公布 WO95 / 25543 英 95.9.28

[85]进入国家阶段日期 96.11.18

[71]申请人 斯克里普斯研究学院

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 P·布鲁克斯

D·A·切列殊

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 姜建成

权利要求书 3 页 说明书 64 页 附图页数 23 页

[54]发明名称 用于抑制血管生成的方法和组合物

[57]摘要

本发明涉及用玻璃体结合蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂抑制血管生成的方法,特别是用含 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂的治疗组合物抑制炎症组织和肿瘤组织和转移瘤中的血管生成。

(BJ)第 1456 号

权 利 要 求 书

- 1.一种抑制组织中血管生成的方法，包括给所述组织施用含血管生成抑制量的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂的组合物。
- 2.权利要求1的方法，其中所述 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂抑制纤维蛋白原与 $\alpha_v\beta_3$ 的结合，但基本上不抑制纤维蛋白原与 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 或 $\alpha_v\beta_1$ 的结合。
- 3.权利要求1的方法，其中所述 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂是 $\alpha_v\beta_3$ 免疫特异性的单克隆抗体。
- 4.权利要求3的方法，其中所述单克隆抗体具有单克隆抗体LM609(ATCC HB 9537)的免疫反应特性。
- 5.权利要求1的方法，其中所述 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂是含RGD的多肽。
- 6.权利要求5的方法，其中所述多肽选自c-(GrGDFV)(SEQ ID NO 4)，c-(RGDFV)(SEQ ID NO 5)，c-(RGDFv)(SEQ ID NO 7)和YTAECKPQVTRGDVF(SEQ ID NO 8)及其盐。
- 7.权利要求6的方法，其中所述盐是盐酸盐或三氟乙酸盐。
- 8.权利要求1的方法，其中所述组织是炎症性的，所述血管生成是炎症性的组织血管生成。
- 9.权利要求1的方法，其中所述组织是关节炎的组织。
- 10.权利要求9的方法，其中所述关节炎的组织出现于患风湿性关节炎的哺乳动物。
- 11.权利要求9的方法，其中所述组织是糖尿病性视网膜病患者的视网膜组织，所述血管生成是视网膜血管生成。
- 12.权利要求1的方法，其中所述组织是血管瘤。
- 13.权利要求1的方法，其中所述组织是实体瘤或实体瘤转移瘤，所述血管生成是肿瘤血管生成。
- 14.权利要求1的方法，其中所述血管生成抑制量是约 $2\mu\text{M}$ - $5\mu\text{M}$ 。
- 15.权利要求1的方法，其中所述施用包括静脉内，经皮，滑膜内，肌内或口服给药。
- 16.权利要求1的方法，其中所述施用与化疗结合完成。
- 17.权利要求1的方法，其中所述施用包括单剂量静脉内施用。
- 18.一种使组织中已形成的肿瘤退化的方法，包括给所述组织施用含血管生成抑制量的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂的组合物。

- 19.权利要求 18 的方法，其中所述 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂抑制纤维蛋白原与 $\alpha_v\beta_3$ 的结合，但基本上不抑制纤维蛋白原与 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 或 $\alpha_v\beta_1$ 的结合。
- 20.权利要求 18 的方法，其中所述 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂是 $\alpha_v\beta_3$ 免疫特
5 异性的单克隆抗体。
- 21.权利要求 20 的方法，其中所述单克隆抗体具有单克隆抗体 LM609 (ATCCHB 9537) 的免疫反应特性。
- 22.权利要求 18 的方法，其中所述 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂是含 RGD 的多肽。
- 23.权利要求 22 的方法，其中所述多肽选自 c-(GrGDFV)(SEQ ID
10 NO 4), c-(RGDfV)(SEQ ID NO 5), c-(RGDFv) (SEQ ID NO 7) 和 YTAECKPQVTRGDVF (SEQ ID NO 8) 及其盐。
- 24.权利要求 23 的方法，其中所述盐是盐酸盐或三氟乙酸盐。
- 25.权利要求 18 的方法，其中所述组织是炎症性的，所述血管生成是炎症性的组织血管生成。
- 15 26.权利要求 25 的方法，其中所述组织是关节炎的组织。
- 27.权利要求 26 的方法，其中所述关节炎的组织存在于患类风湿性关节炎的哺乳动物中。
- 28.权利要求 18 的方法，其中所述组织是糖尿病性视网膜病患者的视网膜组织，所述血管生成是视网膜血管生成。
- 20 29.权利要求 18 的方法，其中所述组织是血管瘤。
- 30.权利要求 18 的方法，其中所述组织是实体瘤或实体瘤转移瘤，所述血管生成是肿瘤血管生成。
- 31.权利要求 18 的方法，其中所述血管生成抑制量是约 2 μ M-5 μ M。
- 25 32.权利要求 18 的方法，其中所述施用包括静脉内，经皮，滑膜内，肌内或口服给药。
- 33.权利要求 18 的方法，其中所述施用与化疗结合完成。
- 34.权利要求 18 的方法，其中所述施用包括单剂量静脉内施用。
- 35.权利要求 18 的方法，在施用所述血管生成抑制拮抗剂后 7 天发
30 生所述退化。
- 36.在组织的新脉管结构中诱导细胞凋亡的方法，包括该所述组织施用含血管生成抑制量的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂的组合物。

37. 权利要求 36 的方法, 其中所述 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂抑制纤维蛋白原与 $\alpha_v\beta_3$ 的结合, 但基本上不抑制纤维蛋白原与 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 或 $\alpha_v\beta_1$ 的结合。

5 38. 权利要求 36 的方法, 其中所述 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂是 $\alpha_v\beta_3$ 免疫特异性的单克隆抗体。

39. 权利要求 38 的方法, 其中所述单克隆抗体具有单克隆抗体 LM609 (ATCCHB 9537) 的免疫反应特性。

40. 权利要求 36 的方法, 其中所述 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂是含 RGD 的多肽。

10 41. 权利要求 40 的方法, 其中所述多肽选自 c-(GrGDFV)(SEQ ID NO 4), c-(RGDFV)(SEQ ID NO 5), c-(RGDFv) (SEQ ID NO 7) 和 YTAECKPQVTRGDVF (SEQ ID NO 8) 及其盐。

42. 权利要求 41 的方法, 其中所述盐是盐酸盐或三氟乙酸盐。

43. 权利要求 36 的方法, 其中所述组织是炎症性的, 所述血管生成是炎症性的组织血管生成。

15 44. 权利要求 43 的方法, 其中所述组织是关节性组织。

45. 权利要求 44 的方法, 其中所述关节炎性组织存在于患类风湿性关节炎的哺乳动物中。

46. 权利要求 36 的方法, 其中所述组织是糖尿病性视网膜病患者的视网膜组织, 所述血管生成是视网膜血管生成。

20 47. 权利要求 36 的方法, 其中所述组织是血管瘤。

48. 权利要求 36 的方法, 其中所述组织是实体瘤或实体瘤转移瘤, 所述血管生成是肿瘤血管生成。

49. 权利要求 36 的方法, 其中所述血管生成抑制量是约 2 μ M-5 μ M。

25 50. 权利要求 36 的方法, 其中所述施用包括静脉内, 经皮, 滑膜内, 肌肉或口服给药。

51. 权利要求 36 的方法, 其中所述施用与化疗结合完成。

52. 权利要求 36 的方法, 其中所述施用包括单剂量静脉内施用。

30 53. 权利要求 36 的方法, 其中所述细胞凋亡在施用所述血管生成抑制拮抗剂后至少 48 小时发生。

54. 权利要求 1 的方法, 其中所述组织是在冠状血管成形术后有再狭窄危险的冠状动脉。

说明书

用于抑制血管生成的方法和组合物

技术领域

- 5 本发明主要涉及医药领域,具体涉及用玻璃体结合蛋白受体 $\alpha_v\beta_3$ 的拮抗剂抑制组织血管生成的方法和组合物。

背景

- 10 整合素是一类已知结合细胞外基质蛋白质的细胞受体,因此介导细胞-细胞和细胞-细胞外基质间的相互作用,这些相互作用通常称为细胞粘附过程。但是,尽管在文献中描述了许多整合素和结合整合素的配体,但仍不清楚整合素的许多生物学功能。整合素受体构成了一个蛋白质家族,它们结构上的共同特征是均有由 α 和 β 亚单位形成的非共价异二聚糖蛋白。

- 15 现在已知玻璃体结合蛋白受体(其命名是因其与玻璃体结合蛋白优先结合的源特征而得)有三种不同的整合素,称为 $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, 和 $\alpha_v\beta_5$, (霍顿,国际实验病理学杂志 71:741-759(1990))。 $\alpha_v\beta_1$ 结合纤维蛋白结合素和玻璃体结合蛋白。 $\alpha_v\beta_3$ 结合许多配体,包括纤维蛋白,纤维蛋白原,层粘连蛋白,血小板反应素,玻璃体结合蛋白,遗传性假血友病因子,骨反应素和骨唾液蛋白 I。 $\alpha_v\beta_5$ 结合玻璃体结合蛋白。在组织中的许多细胞间相互作用中,这三种整合素所起特异性细胞粘附作用尚在研究中,但很清楚的是有许多有不同生物功能的不同整合素。

- 25 在许多整合素的配体中,一个重要的识别位点是精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)三肽序列。在所有上述鉴定的玻璃体结合蛋白受体整合素的配体中均发现了RGD。用含RGD序列的多肽(“肽”)可以模拟所述RGD识别位点,而且已知所述RGD肽是整合素功能的抑制剂。但是,值得注意的是,根据RGD肽的序列和结构,可以改变所述抑制作用对靶特异性整合素的特异性。

- 30 有关RGD识别位点的讨论,参见彼尔赫巴赫等,自然,309:30-33(1984),和彼尔赫巴赫等,Proc.Natl.Acad.Sci. USA,81:5985-5988(1984)。格兰特等人,细胞,58:933-943(1989),切利西等人,细

胞,58:945-953(1989),奥米雷等人, FEBS Letts.,291:50-54(1991),和费福等人, 生物化学杂志.,269: 20233 - 20238 (1994) 和美国专利申请 Nos.4,517,686 , 4,578,079 , 4,589,881 , 4,614,517 , 4,661,111 , 4,792,525 , 4,683,291 , 4,879,237 , 4,988,621 , 5,041,380 和 5,061,693 。

血管生成是涉及使新发育的血管生长成组织的组织血管形成过程, 而且也称为新血管形成。所述过程是由内皮细胞和平滑肌细胞的浸润介导的。认为所述过程从三条途径中的任一条发展: 脉管从预存在的脉管萌发, 从前体细胞重新发育脉管(血管发生)或使存在的小脉管的直径增大。布拉德等人, Bioch.Biophys.Acta,1032:89-118(1990)。已知血管内皮细胞至少含有五种玻璃体结合蛋白受体($\alpha_v\beta_3$, 或 $\alpha_v\beta_5$), 胶原蛋白 I 和 IV 型受体($\alpha_1\beta_1$), 层粘连蛋白受体($\alpha_2\beta_1$), 纤维蛋白连接素/层粘连蛋白/胶原蛋白受体($\alpha_3\beta_1$)和纤维蛋白连接素受体($\alpha_5\beta_1$)。Davis 等人, J.Cell.Biochem.,51:206-218(1993)。
10 已知平滑肌细胞至少含有六种 RGD 依赖性的整合素, 包括 $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, 和 $\alpha_v\beta_5$ 。

血管生成是新生儿生长中的重要过程, 而且在伤口愈合和许多临床疾病的发病机理中也是重要的, 所述临床疾病包括组织炎症, 关节炎, 肿瘤生长, 糖尿病引起的视网膜病变, 因视网膜的新血管形成而产生的退化斑等疾病。将与血管生成相关的这些临床表现称为血管生成性疾病。福克曼等人 Science,235:442-447(1987)。在成人或成熟组织中通常没有血管生成, 但在伤口愈合和 corpeus leuteum 生长循环中肯定会发生。参见例如, 莫斯等人, Science,248:1048-1410(1990)。
20

已经建议抑制血管生成是限制肿瘤生长的有效治疗方法。已经通过
25 (1) 抑制“血管生成分子”, 如 β FGF (成纤维细胞生长因子)的释放, (2) 如用抗 β FGF 抗体中和血管生成分子, 和 (3) 抑制内皮细胞对血管生成刺激的反应来抑制血管生成。后一种方法已经受到注意, 而且 Folkman 等人, 癌症生物学, 3:89-96(1992)还描述了数种内皮细胞反应抑制剂, 包括胶原酶抑制剂, 基膜更新 turnover 抑制剂,
30 angiostatic steroids, 真菌衍生的血管生成抑制剂, 血小板因子 4, 血小板反应素, 关节炎药物, 如 D - 青霉胺和 gold thiomalate, 维生素 D₃类似物, α - 干扰素, 及可用于抑制血管生成的那些药物。其他建议

的血管生成抑制剂，参见布拉德等人，系列化及生理学学报，1032:89-118(1990)，莫斯等人，Lab.Invest.,59:44-51(1988)，和美国专利申请Nos.5,092,885,5,112,946,5,192,744和5,202,352。在前述参考文献中描述的血管生成抑制剂中没有一个是抑制 $\alpha_v\beta_3$ 为靶的。

5 还描述了抑制玻璃体结合蛋白受体 $\alpha_v\beta_3$ 的含RGD的肽。Aumailley等人,FEBS Letts.,291:50-54(1991),Choi等人J.Vasc.Surg.,19:125-134(1994),Smith等人,生物化学杂志.,265:12267-12271(1990)和费福等人,生物化学杂志,269:20233-20238(1994)。到本发明为止，既未说明也未鉴定整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在血管生成中的作用。

10 在包括微血管内皮细胞的各种细胞类型的细胞粘附中，使用各种整合素 α 和 β 亚单位免疫特异性的单克隆抗体进行的体外细胞粘附的抑制，均涉及 $\alpha_v\beta_3$ 。戴维斯等人，细胞生物学杂志,51:206-218(1993)。此外，尼克西亚等人Am.J.Pathol.,138:829-833(1991)描述了使用RGD肽GRGDS体外抑制在胶原蛋白凝胶中培养的大鼠主动脉形成“微血管”。然而，在胶原蛋白凝胶培养物中，体外抑制“微血管”的形成并不是抑制组织中血管生成的模型，因为它不能表明微血管结构与毛细管萌发物一样，或者在胶原蛋白培养中微血管的形成与新血管生长成完整组织，如需要抑制血管生成的关节组织，肿瘤或疾病组织一样。

15 因此，除本文报道的研究外，申请人不知道用细胞粘附抑制剂可以抑制组织中血管生成的任何其他说明。特别是，以前从未说明在组织中的血管生成需要 $\alpha_v\beta_3$ 或 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂可抑制组织中的血管生成。

本发明概述

20 本发明公开说明组织中的血管生成需要整合素 $\alpha_v\beta_3$ ， $\alpha_v\beta_3$ 的抑制剂可以抑制血管生成。本公开还说明其他整合素如 $\alpha_v\beta_5$ 或 $\alpha_v\beta_1$ 的拮抗剂并不抑制血管生成，推测是因为这些其他的整合素对于血管生成不是必需的。

因此，本发明描述了抑制组织中血管生成的方法，包括给所述组织施用含有血管生成抑制量的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂的组合物。

30 待治疗的组织可以是任何需要抑制其中血管生成的组织，如发生新血管形成的疾病组织。举证性的组织包括炎症组织，固体肿瘤，转移瘤，发生再狭窄的组织等组织。

用于本发明方法的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂能够与 $\alpha_v\beta_3$ 的结合并有竞争性

抑制 $\alpha_v\beta_3$ 与天然配体结合的能力。优选的，所述拮抗剂对 $\alpha_v\beta_3$ 的特异性超过其他整合素。在具体的实施方案中， $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂抑制纤维蛋白原或含 RGD 的其他配体与 $\alpha_v\beta_3$ 的结合，但基本上不抑制纤维连接素与 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 的结合。优选的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂可以是与 $\alpha_v\beta_3$ 发生免疫反应的多肽或单克隆抗体，或其功能片段。

附图的简要描述

在构成本公开的一部分的附图中：

10 图 1A - 1D 说明在正常皮肤和在称为肉芽组织的正在伤口愈合的皮肤中，整合素亚单位 β_3 和 β_1 的组织分布。按实施例 3A 中的描述完成 β_3 和 β_1 抗体的免疫组织化学。图 1A 和 1B 分别说明在正常皮肤和肉芽组织中抗 - β_3 的免疫反应性。图 1C 和 1D 分别说明在正常皮肤和肉芽组织中抗 - β_1 的免疫反应性。

15 图 2A - 2D 说明在正常皮肤和在称为肉芽组织的正在伤口愈合的皮肤中，分别结合整合素 β_3 和 β_1 亚单位的遗传性假血友病因子和层粘连蛋白配体的组织分布。按实施例 3B 中的描述完成遗传性假血友病因子抗体（抗 - vWF）和层粘连蛋白抗体（抗 - 层粘连蛋白）的免疫组织化学。图 2A 和 2B 分别说明在正常皮肤和肉芽组织中抗 - vWF 的免疫反应性。图 2C 和 2D 分别说明在正常皮肤和肉芽组织中抗 - 层粘连蛋白的免疫反应性。

20 图 3A - 3D 说明分别在膀胱癌，结肠癌，乳腺癌和肺癌的活检中玻璃体结合蛋白整合素受体的组织分布。按实施例 3C 中的描述完成用抗 $\alpha_v\beta_3$ LM609 抗体的免疫组织化学。

图 4 说明在未处理的 10 天鸡胚中，没有血管的本发明 CAM 的典型显微照片。按实施例 5B 中的描述制作。

25 图 5A - 5C 说明在本发明的 CAM 制品中整合素 β_1 和 $\alpha_v\beta_3$ 的组织分布。图 5A 表示用 CSAT（一种抗 β_1 抗体）的免疫荧光免疫反应性检测，在未处理的 10 天 CAM 制品中 β_1 亚单位的分布。图 5B 表示用 LM609（一种抗 $\alpha_v\beta_3$ 抗体）的免疫荧光免疫反应性检测，在未处理的 10 天 CAM 制品中 $\alpha_v\beta_3$ 受体的分布。图 5C 表示图 5B 表示用
30 LM609（一种抗 $\alpha_v\beta_3$ 抗体）的免疫荧光免疫反应性检测，在 β FGF 处理的 10 天 CAM 制品中 $\alpha_v\beta_3$ 受体的分布。在实施例 5C 中描述了所述处理和结果。

图 6 按实施例 6A 中所述, 在未处理和 β FGF 处理的 10 天 CAMs 中, $\alpha_v\beta_3$ 和 β_1 相对表达的条形图的定量分析。Y 轴是平均荧光强度, X 轴是整合素图形。

图 7A - 7C 分别说明未处理的 10 天 CAM 和 β FGF 处理的 CAM 和 TNF α 处理的 CAM 的出现, 在实施例 6A 中描述了其方法和结果。

图 8A - 8E 说明, 按实施例 7A1) 中所述, 局部抗体处理对 FGF 诱导的血管生成的影响。图 8A 表示未处理的 CAM 制品, 即没有血管。图 8B 说明新血管形成浸润到以前用 β FGF 诱导的没有血管形成的区域中。图 8C, 8D 和 8E 分别表示抗 β_1 抗体 (抗 - β_1 ; CSAT), $\alpha_v\beta_5$ (抗 - $\alpha_v\beta_5$; P3G2) 和 $\alpha_v\beta_3$ (抗 - $\alpha_v\beta_3$; LM609) 的作用。

图 9A - 9C 静脉内注射合成肽 66203 对按实施例 7D2) 中描述的肿瘤诱导的血管生成的影响。图 9A 表示用对照肽 (对照肽肿瘤) 静脉内处理对于因肿瘤诱导而产生的血管生成没有抑制作用。静脉内注射肽 66203 (环 RGD 肿瘤) 而产生的血管生成抑制作用示于图 9B 中。图 9C 表示在邻接肿瘤处理的区域的区域内, 静脉内输注肽 66203 后, 对预存在的成熟血管没有抑制作用或细胞毒性 (环 RGD 邻接的 CAM)。

图 10A - 10C 说明按实施例 7B1) 中所述, 静脉内施用血管生成诱导的生长因子的单克隆抗体的影响。图 10A 表示 β FGF 诱导的血管生成未经抗体处理 (对照)。按图 10B 所示, 当用 $\alpha_v\beta_5$ 抗体 P3G2 处理相似的制品时, 未产生血管生成抑制作用。如图 10C 所示, 用抗 - $\alpha_v\beta_3$ 抗体 LM609 处理后, 产生血管生成抑制作用。

图 11A - 11C 说明按实施例 7C 所述, 局部施用抗整合素抗体后, 对胚血管生成的影响。在图 11A 和 11B 中分别表示, 用抗 β_1 和抗 $\alpha_v\beta_5$ 抗体处理 6 天 CAM, 血管生成未受到抑制。相反, 如图 11C 所示, 用抗 $\alpha_v\beta_3$ 抗体 LM609 处理会导致抑制血管形成。

图 12 说明按实施例 7D1) 所述, 在 CAM 制品中定量分析进入肿瘤的血管数量。图中 Y 轴表示因局部施用 CSAT (抗 β_1) 和 LM609 (抗 $\alpha_v\beta_3$) 或 P3G2 (抗 $\alpha_v\beta_5$) 而产生的血管数量。

图 13A - 13D 说明按实施例 9A1)a 中所述, 处理 7 天后的湿肿瘤重量和开始肿瘤重量之间的比较。每个条代表每组 5 - 10 个肿瘤的平均值 \pm S.E.. 肿瘤来自人黑色素瘤 (M21 - L) (图 13A), 胰腺癌

(Fg) (图 13B) , 肺癌 (UCLAO - 3) (图 13C) 和喉癌 (HEp3) (图 13D) CAM 制品和用 PBS , CSAT (抗 β_1) 或 LM609 (抗 $\alpha_v\beta_3$) 静脉内处理的制品。在图中, Y 轴表示肿瘤重量, X 轴表示静脉内施用 CSAT (抗 β_1) 和 LM609 (抗 $\alpha_v\beta_3$) 或 PBS。

5 图 14A 和 14B 说明按实施例 9A1)a 中所述, 用 P3G2 (抗 $\alpha_v\beta_5$) (图 14A) 和 LM609 (抗 $\alpha_v\beta_3$) (图 14B) 处理并用苏木精和曙红染色的肿瘤的组织切片。按图 14A 所示, 用对照抗体 (P3G2) 处理的肿瘤在整个肿瘤基质中, 都有由分裂象 (箭头头) 和多血管 (箭头) 表示的许多存活并有活力的正在分裂的细胞。相反, 在图 14B 中, 用
10 LM609 (抗 $\alpha_v\beta_3$) 处理的肿瘤中, 几乎未检测到任何活肿瘤细胞或血管。

图 15A - 15E 对应于实施例 9A1)b 中用肽处理的 M21L 肿瘤并且如下所述: 图 15A, 对照环 RAD 肽 (69601) ; 图 15B, 环 RGD 肽 (66203) ; 图 15C, 从环 RGD 肽 (66203) 处理的相同胚取出的相
15 邻 CAM 组织, 图 15D 是用对照 RAD (69601) 或图 15E 用环 RGD 肽 (66203) 处理的高放大倍数的肿瘤。图 15D 描述了来自 RAD 对照肽 (69601) 处理的肿瘤的正常血管。图 15E 描述了来自环 RGD 肽 (66203) 处理的肿瘤的破裂血管的实例 (箭头) 。

图 16A - 16E 按实施例 10 所述, 在体内兔眼模型试验中通过血管
20 生成拮抗剂而产生的血管生成抑制作用。图 16A 和 16B 描述了存在 β FGF 和 mAbP1F6 时, 兔眼的血管生成。图 16C, 16D 和 16E 描述了存在 β FGF 和 mAb M609 (抗 $\alpha_v\beta_3$) 时, 兔眼的血管生成抑制作用。

图 17 是按实施例 11A 所述, 如何产生体内小鼠: 人嵌合小鼠模型的流程图。用人新生儿的包皮取代 SCID 小鼠的部分皮肤, 然后使其愈
25 合 4 星期。在移植愈合后, 用人肿瘤细胞接种人包皮。在 4 星期后的时间内, 确立的可测量肿瘤, 它包含人肿瘤和从人皮肤生长到人肿瘤中的人血管形成。

图 18 说明用 FACS 分析和分别按实施例 12A 和 12B 所述来自 mAb 处理的和肽处理的 CAMs 和用 Apop Tag 染色的单细胞的百分比。黑色
30 和条纹条分别代表在试验前处理 24 小时和 48 小时的胚胎的细胞。每个条是三个重复样品的平均值 \pm S.E.. 按实施例 12A2) 所述, 用 mAb LM609 (抗 $\alpha_v\beta_3$) 或 CSAT (抗 β_1) 或 PBS 处理 CAMs。还要按

实施例 12B 中所述用环肽 69203 (环 - RGDfV, 表示为肽 203) 或对照环肽 69601 (环 - RADfV, 表示为肽 601) 处理 CAMs.

图 19A 和 19B 说明来自用 CSAT (抗 β_1) (图 19A) 或 LM609 (抗 $\alpha_v\beta_3$) (图 19B) 处理的并按实施例 12C 所述, 用 Apop Tag 及 propidium iodide 染色用 FACS 分析的胚胎之 CAMs 的单细胞悬浮液的结果。Y 轴表示 Apop Tag 染色的细胞数 (细胞凋亡), X 轴表示 propidium iodide 染色 (DNA 含量)。水平线代表了 propidium iodide 染色的负栅(gate)左边和右边的图分别表示来自 CSAT (抗 β_1) (图 19A) 和 LM609 (抗 $\alpha_v\beta_3$) (图 19B) 处理的胚胎的 CAM 细胞。
 5 通过分析每种条件约 8000 个过程来分析细胞周期。

按实施例 12C 所述, 图 20A - 20C 表示来自 CSAT (抗 β_1) 处理的胚胎的 CAM 组织, 图 20D - 20F 表示来自 LM609 (抗 $\alpha_v\beta_3$) 处理的胚胎的 CAM 组织。图 20A 和 20D 描述了用 Apop Tag 染色并通过在 D.I.C. 图像上的荧光增强 (FITC) 而可观察的组织。图 20B 和 20E 描述了用 mAb LM609 (抗 $\alpha_v\beta_3$) 染色并通过荧光 (若丹明) 可观察的相同组织。图 20C 和 20F 表示用 Apop Tag 和 LM609 染色的相同组织的成像, 黄色表示共定位化。左边和右边的图中的条分别表示 15 和 50 μm 。
 15

本发明的详细描述

20 A 定义

氨基酸残基: 在其肽键上, 化学消化 (水解) 多肽后形成的氨基酸。本文描述的氨基酸残基优选的是 "L" 异构体形式。但是, "D" 异构体形式的残基也可以取代任何 L - 氨基酸残基, 只要多肽保持了所需的功能特性即可。NH₂ 指在多肽的氨基末端存在的游离氨基。COOH 指在多肽的羧基末端存在的游离羧基。为了与标准多肽命名一致 (见 J. Biol.Chem.,243:3552-59(1969)和在 37 DFR § 1.822(b)(2)中的改编), 在下类对应表中列出了氨基酸残基的缩写:
 25

对应表

	<u>符号</u>		<u>氨基酸</u>
30	<u>1 - 字母</u>	<u>3 - 字母</u>	
	Y	Tyr	酪氨酸
	G	Gly	甘氨酸

	F	Phe	苯丙氨酸
	M	Met	甲硫氨酸
	A	Ala	丙氨酸
	S	Ser	丝氨酸
5	I	Ile	异亮氨酸
	L	Leu	亮氨酸
	T	Thr	苏氨酸
	V	Val	缬氨酸
	P	Pro	脯氨酸
10	K	Lys	赖氨酸
	H	His	组氨酸
	Q	Gln	谷氨酰胺
	E	Glu	谷氨酸
	Z	Glx	谷氨酰胺和/或谷氨酸
15	W	Trp	色氨酸
	R	Arg	精氨酸
	D	Asp	天冬氨酸
	N	Asn	天冬酰胺
	B	Asx	天冬氨酸和/或天冬酰胺
20	C	Cys	胱氨酸
	X	Xaa	未知/其他

此外，下列缩写有下列含义：

- BOC 叔-丁基氧羰基
DCCI 二环己基碳化二亚胺
25 DMF 二甲基甲酰胺
OMe 甲氧基
HOBt 1-羟基 benzotriazole

30 应注意到本文式子表示所有氨基酸需，其左右取向是从氨基末端到羧基末端的常规方向。此外，应注意到在氨基酸残基序列开始或终止的破折号表示与另一个或多个氨基酸残基序列的肽键。

多肽：指通过肽键彼此相连的线性氨基酸残基系列，所述肽键是相

邻氨基酸残基的 α 氨基和羧基之间的。

肽：本文所用的是指象在多肽中一样彼此相连的不超过 50 个氨基酸残基的线性系列。

5 环肽：得自相应的线性肽，而且指其中不存在游离 N - 或 C - 末端的肽和；其相应线性肽的 N - 末端与所述相应线性肽的 C - 末端羧化物形成酰胺。

蛋白质：指象在多肽中一样彼此相连的超过 50 个氨基酸残基的线性系列。

10 合成肽：指化学产生的通过肽键连在一起的氨基酸残基链，即不是天然产生的蛋白质和其片段。

B 一般考虑

15 本发明主要涉及发现特异性玻璃体结合蛋白受体 $\alpha_v\beta_3$ 介导的血管生成，以及抑制 $\alpha_v\beta_3$ 的功能可以抑制血管生成。由于血管生成在各种疾病过程中起着作用，所以所述发现是很重要的。通过抑制血管生成，人们可以干预疾病，改善症状，而且在某些情况下还可以治愈疾病。

20 如果新血管的生长是疾病的起因或对于与疾病有关的病理学有影响，那么抑制血管生成就可以降低所述疾病的有害影响。实例包括类风湿性关节炎，糖尿病视网膜病，炎症疾病，再狭窄等。如果需要新血管的生长来支持有害组织的生长，那么抑制血管生成就可以减少供应到所述组织的血液，由此降低以血液供应为基础的组织量。实例包括肿瘤生长，其中需要持续的新血管形成以便肿瘤生长到数毫米厚以上。

25 本发明方法是部分有效的，原因在于所述治疗对于血管生成是高度选择性的，而且应没有其他生物学过程。正如在实施例中所表明的，只有新血管生长含大量的 $\alpha_v\beta_3$ ，因此，所述治疗方法并不能对成熟血管产生根本的影响。因此， $\alpha_v\beta_3$ 不能广泛地分布在正常组织中，而只对新血管有选择性，由此确保所述治疗只是选择性地以新血管生长为靶目标。

30 仅仅抑制 $\alpha_v\beta_3$ 就可以有效地抑制血管生成这一发现，使得可以研制有潜在的高度特异性，而因此相对低毒性的治疗组合物。因此，尽管本发明公开了使用具有抑制一种或多种整合素能力的肽为基础的试剂，但是，人们还可以设计其他更加选择性地抑制 $\alpha_v\beta_3$ ，并因此对于由 $\alpha_v\beta_3$ 介导的其他生物学过程没有抑制副作用的其他试剂。

例如，由本发明所教导的，可以制备与 $\alpha_v\beta_3$ 的免疫反应有高度选择性的单克隆抗体，所述选择性对于抑制 $\alpha_v\beta_3$ 功能是相似的选择性。此外，按本文进一步描述，可以设计含 RGD 的肽以选择性地抑制 $\alpha_v\beta_3$ 。

5 在本发明的发现之前，尚不知道使用拮抗 $\alpha_v\beta_3$ 生物学功能的试剂可以体内抑制血管生成以及依赖于血管生成的任何过程。

C 抑制血管生成的方法

10 本发明提供了在组织中抑制血管生成的方法，并由此抑制组织中依赖于血管生成的过程。总之，所述方法包括给组织施用含有抑制血管生成量的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂的组合物。

如前文描述的，血管生成包括与组织的新血管形成包括“萌发”，血管发生或血管增大有关的各种过程，其中所有的血管生成过程均由 $\alpha_v\beta_3$ 的表达停导由并依赖于 $\alpha_v\beta_3$ 的表达。除外伤的伤口愈合，黄体形成和胚胎发生外，认为大多数血管生成过程都是与疾病过程有关的，因此，本发明治疗方法的使用是疾病选择性的，而且不会有有害的副作用。

20 有各种认为在其中血管生成是很重要的疾病，称为血管生成疾病，包括但不限于炎症性的紊乱，如免疫或非免疫炎症，慢性关节风湿病和牛皮癣，与不适当的或不合时宜的血管侵入有关的疾病，如糖尿病视网膜病，新血管青光眼，再狭窄，动脉粥样硬化斑和骨质疏松症中的毛细血管增殖，以及癌症有关的疾病，如实体瘤，实体瘤转移瘤，血管纤维瘤，晶体后纤维增生症，血管瘤，卡波济肉瘤和需要新血管形成以支持肿瘤生长的癌症。

25 因此，抑制疾病组织中血管生成的方法可以改善疾病和与疾病有关的症状，甚至可以治愈疾病。在一个实施方案中，本发明在组织中抑制的血管生成本身。组织中血管生成的程度和用本发明方法达到的抑制程度可以用各种方法来评价，如在用免疫组织化学有关检测 $\alpha_v\beta_3$ -免疫阳性不成熟和新生儿血管结构的实施例中所描述的那些。

30 如本文所述，在血管生成刺激后在疾病状态下，任何组织或含有机化组织的器官均可支持血管生成。包括皮肤，肌肉，肠，结缔组织，关节，骨及血管可侵入的组织

因此，在一个相关的实施方案中，待处理的组织是发炎的组织，而

且待抑制的血管生成是发炎组织的血管生成，其中存在发炎组织的新血管形成。在这种情况下，所述方法抑制了如患慢性关节风湿病患者中的关节组织，免疫或非免疫炎症组织或 psoriatic 组织等中的血管生成。

5 在本发明的许多实施方案中，所治疗的患者都是人，尽管应该理解，本发明的原理认为本发明对于所有哺乳动物都是有效的，这些都包括在“患者”的范围内。在本文中，哺乳动物应被理解为需要治疗与血管生成有关的疾病的任何哺乳动物，特别是农业和家养的哺乳动物。

10 在另一相关的实施方案中，待治疗的组织是患糖尿病视网膜病，斑点退化或新血管性青光眼之患者的视网膜组织，待抑制的血管生成是有视网膜组织的新血管形成的视网膜组织的血管生成。

15 在另一相关的实施方案中，待治疗的组织是患实体瘤，转移瘤，皮肤癌，乳腺癌，血管瘤或血管纤维瘤等之患者的肿瘤组织，待抑制的血管生成是有治疗组织的新血管形成的治疗组织血管生成。用本发明方法可治疗的典型实体瘤包括肺，胰腺，乳腺，结肠，喉，卵巢等组织。在
15 实施例中描述了举证性的肿瘤组织血管生成及其抑制。

由于新血管形成在肿瘤生长中起重要作用，所以抑制肿瘤组织的血管生成是特别优选的实施方案。如果肿瘤组织中没有新血管形成，那么肿瘤组织就不会得到所需的营养，生长缓慢，停止进一步的生长，退化并最终坏死，从而杀死肿瘤。

20 换句话说，本发明通过用本发明方法抑制肿瘤血管生成而提供了抑制肿瘤新血管形成的方法。相似的，本发明通过实施抑制血管生成的方法而提供了抑制肿瘤生长的方法。

25 本发明方法对于抗转移瘤的形成是特别有效的，原因在于（1）转移瘤的形成需要初级肿瘤的血管形成以便转移性的癌细胞可以离开初级肿瘤和（2）其在二级位点的确立需要新血管形成以便支持转移瘤的生长。

30 在相关的实施方案中，本发明与其他治疗方法相结合来实施本发明方法，所述其他方法如直接针对实体治疗并控制转移瘤确立的常规化学疗法。通常在化疗期间或之后施用血管生成抑制剂，尽管优选的是在化疗后抑制血管生成，在这时肿瘤组织为了恢复，正通过诱导血管生成来给肿瘤组织提供血液供应和营养，从而对毒性攻击作出反应。另外，优选的是在为了预防转移瘤，已将实体肿瘤切除的外科手术后实施血管生

成抑制方法。

在本发明方法用于抑制肿瘤新相关形成来说，所述方法还可用于抑制肿瘤组织生长，抑制肿瘤转移瘤的形成，并使建立的肿瘤退化。实施例描述了在一次静脉内施用本发明的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂后，建立的肿瘤发生了退化。

再狭窄是在经皮 transluminal 冠状动脉血管成形术位点上，平滑肌细胞 (SMC) 迁移和增殖的过程，它妨碍了血管成形术的成功。可以认为，在再狭窄过程中 SMC 的迁移和增殖是血管生成过程，可以用本发明方法加以抑制。因此，本发明还通过用本发明方法抑制血管成形术后，患者中的血管生成而抑制再狭窄。为了抑制再狭窄，通常在血管成形术后有约 2 - 约 28 天，通常是在所述过程后约头 14 施用 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂。

用于抑制组织中的血管生成的本发明方法，并因此治疗血管生成相关的疾病的方法包括将有血管生成发生或有血管生成危险的组织与含有治疗有效量的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂的组合物接触，所述 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂能够抑制 $\alpha_v\beta_3$ 与其天然配体结合。因此，本发明方法包括给患者施用治疗有效量的含本发明 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂的生理可耐受的组合物。

施用 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂的剂量范围如本文进一步描述的，取决于拮抗剂的形式，其能力，而且剂量应大到足以产生所需的效应其中血管生成和由血管生成介导的疾病症状得到改善。所述剂量不应大到引起副作用，如高粘稠度综合症，肺水肿，充血性心力衰竭等。通常，所述剂量随年龄，状态，性别以及患者疾病的程度而变化，而且是本领域专业人员可以确定的。在任何复杂的情况下，可以由具体医生来调整所述剂量。

治疗有效量是在待治疗的组织中， $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂足以产生可测量的血管生成抑制作用的量，即抑制血管生成的量。如本文所述，用免疫组织化学在原位或通过本领域专业人员熟知的其他方法，可以测量血管生成的抑制作用。

在 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂可以取 $\alpha_v\beta_3$ 模拟形式的，含 RGD 的肽，抗 $\alpha_v\beta_3$ 单克隆抗体或其片段的情况下，应理解潜力和“治疗有效”量的表达形式是可以变化的。但是正如用本发明试验方法所表明的，本领域技术人员很容易评价本发明候选 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂的潜力。

用各种方法，包括在 CAM 试验，体内兔眼试验，体内嵌合小鼠：人试验中的血管生成抑制作用，以及通过测量与 $\alpha_v\beta_3$ 天然配体结合的抑制作用（所有均如本文所述）等试验可以测量 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂的潜力。

5 优选的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂有能力溶液中基本上抑制天然配体如纤维蛋白原或玻璃体结合蛋白与 $\alpha_v\beta_3$ 的结合，所述拮抗剂的浓度为低于 0.5 微摩尔 (μm)，优选的低于 0.1 μm ，且最好为低于 0.05 μm 。

“基本上”指在存在 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂时，通过抑制而使纤维蛋白原的结合降低了至少 50%，而 50% 的抑制在本文中称为 IC_{50} 值。

10 更优选的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂对 $\alpha_v\beta_3$ 的选择性超过其他整合素。因此，优选的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂基本上抑制了纤维蛋白原与 $\alpha_v\beta_3$ 的结合，但基本上不抑制纤维蛋白原与其他整合素如 $\alpha_v\beta_1$ ， $\alpha_v\beta_5$ ，或 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 的结合。特别优选的是与抑制纤维蛋白原结合 $\alpha_v\beta_3$ IC_{50} 活性与抑制纤维蛋白原结合至另一整合素的 IC_{50} 活性相比，低 10 倍 - 100 倍的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂。在实施例 15 中描述了用于测量抑制纤维蛋白原与一整合素结合的 IC_{50} 活性的举证性试验。

单克隆抗体形式的本发明 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂的治疗有效量通常是这样一个量，当以生理可耐受的组合物施用 20 时，足以得到约 0.01 微克 (μg) /ml - 约 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，优选的约 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - 约 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，而且最好是约 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血浆浓度。换种方式说，在每天一个或多剂量施用一天或数天时，所述剂量可以从约 0.1 mg/kg - 约 300 mg/kg，最好从 0.5 mg/kg - 约 20 mg/kg 变化。

在所述拮抗剂是单克隆抗体片段形式的情况下，根据相对于整抗体的片段的量可以调整所述片段量。25 优选的血浆克分子浓度为从约 2 微摩尔 (μM) - 约 5 毫摩尔 (mM)，更优选的为约 100 μM - 约 1 mM 抗体拮抗剂。

本发明多肽或其他相似大小的小分子 $\alpha_v\beta_3$ 模拟形式的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂的治疗有效量通常是这样一种多肽量，30 当作为生理可耐受组合物施用 时，足以达到约 0.1 微克 (μg) /ml - 约 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，优选的约 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - 约 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血浆浓度。以质量为约 500g/mol 的多肽为基础，优选的克分子血浆浓度为约 2 微摩尔 (μM) - 约 5 毫摩尔 (mM)，而且更优选的为约 100 μM - 约 1 mM 多肽拮抗剂。换种方式说，在

每天一个或多剂量施用一天或数天时，每单位体重的剂量可以从 0.1 mg/kg - 约 300 mg/kg，优选的从 0.2 mg/kg - 约 200 mg/kg 变化。

5 可以通过注射或在一定时间内逐渐输注而不经肠施用本发明的单克隆抗体或多肽。尽管待治疗的组织通常通过全身施用而进入体内，而且因此最经常地是通过静脉内施用治疗组合物而进行治疗，但是，在其他靶组织含有靶分子的可能情况下，也可以考虑其他组织和给药方式。因此，可以静脉内，腹膜内，肌内，皮下，腔内，皮内施用本发明的单克隆抗体或多肽，并可通过蠕动方式给药。

10 含本发明单克隆抗体或多肽的治疗组合物通过例如注射单位剂量而经静脉内常规施用。提到本发明治疗组合物时所用的术语“单位剂量”是指适于受治疗者的单元剂量的物理上的独立单位，每单位含计算过的预定量的活性物质，在与所需的稀释剂，即载体结合产生所需的治疗效果。

15 在如实施例所示的一个优选的实施方案中，静脉内单剂量施用 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂。

20 以与剂量配方相协调的方式，以治疗有效量施用所述组合物。所施用一的量和时间取决于受治疗者，受治疗者系统利用活性成分的能力，以及所要达到的治疗效果。所需施用的活性成分的精确量取决于医生的判断并为每个个体所特有的。然而，在本文中公开了用于全身施用的适宜剂量范围，而且取决于施用的途径。适宜的施用方式也是可以改变的，但由开始的施用方式代表，然后以一或数小时间隔通过注射或其他施用方式重复给药。另外，可以连续静脉内输注以足以血液中浓度保持在用于体内治疗的特定范围内。

25 正如本发明实施例所说明的，血管生成的抑制作用和肿瘤退化发生在开始与拮抗剂接触后的 7 天。然后再暴露延长包括于拮抗剂 7 天到 6 星期，优选的约 14 天到 28 天。

30 在一个相关的实施方案中，实施例说明了在带有 $\alpha_v\beta_3$ 的新脉管结构细胞中， $\alpha_v\beta_3$ 的抑制作用和细胞凋亡诱导之间的关系。因此，本发明还提供了在组织的新脉管结构中抑制细胞凋亡的方法。按本文所述用所述方法基本上抑制了所有组织的血管生成和因此而产生的疾病状态。如本文所述，唯一值得注意的区别是时间效果，细胞凋亡明显地快，通常是在接触拮抗剂后约 48 小时，而血管生成的抑制和肿瘤退化

明显地要慢。这一不同接施用时间而言影响了治疗方式，和所需的效果。通常用于新脉管结构细胞凋亡给药可持续 24 小时到约 4 星期，尽管优选的是 48 小时到 7 天。

D 治疗组合物

5 本发明提供了用于实施本文所述治疗方法的治疗组合物。本发明的治疗组合物含有生理学可耐受的载体以及本文所述的作为活性成分的溶解的或分散的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂。在一个优选的实施方案中，当给哺乳动物或人患者施用用于治疗目的时，治疗性 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂组合物不是致免疫的。

10 正如本文所用的，在提到组合物，载体，稀释剂和试剂时，术语“药理学可接受的”“生理学耐受的”以及其语法变体均可互换的使用，而且指能够将所述物质施用于哺乳动物或在施用给哺乳动物后，不会产生不期望的生理学效果如恶心，头晕，胃不适等。

15 含溶解的或分散的活性成分之药理学组合物的制备方法是本领域熟知的，而且不需以配方为基础而加以限制。通常可以将所述组合物制备成可注射的如液体溶液或悬浮液，但也可制备成在适于在使用前于液体中配成溶液或悬浮液的固体形式。还可将制剂乳化。

20 可以将活性成分与药理学可接受并与活性成分相容以及适用于本文所述治疗方法使用的量的稀释剂混合。适宜的稀释剂例如是水，盐，右旋糖，甘油，乙醇等及其组合。另外，如果需要，所述组合物还可含有少量的助剂物质，如湿润剂或乳化剂，pH 缓冲剂等提高活性成分效力的物质。

25 本发明的治疗组合物可包含其组分药理学可接受的盐。药理学可接受的盐包括与无机酸，如盐酸或磷酸或有机酸如乙酸，酒石酸，扁桃酸等形成的酸加成盐（与多肽的游离氨基形成的）。从无机碱如氢氧化钠，钾，铵，钙或铁以及有机碱如异丙基胺，三甲基胺，1-乙基氨基乙醇，组氨酸，普鲁卡因等可以衍生与游离羧基形成的盐。

当在制备环多肽 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂时使用，特别优选的是 TFA 和 HCl 的盐。在实施例中描述了肽的代表性盐。

30 生理学可耐受的载体是本领域熟知的。液体载体的实例是不含除活性成分和水以外的物质的，或含缓冲液，如在生理 pH 的磷酸钠，生理盐或两者，如磷酸缓冲的盐的灭菌含水溶液。含水载体还可含有一种以

上的缓冲盐，以及象氯化钠和钾，右旋糖，聚乙二醇和其他溶质的盐液体组合物还可含有除水之外并不包括水在内的液体相。所述其他液体相的实例是甘油，植物油，如棉籽油，和水-油乳液。

5 治疗组合物含有抑制血管生成量的本发明 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂，通常配制后，每单位总治疗组合物重含有注射 0.1 % 重的拮抗剂。重量百分比是抑制剂与总组合物的重量比。因此，例如，0.1% 重是每 100 克总组合物有 0.1 克的抑制剂。

E 整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的拮抗剂

10 在用于抑制组织中血管生成的本发明方法中使用了 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂，而且所述拮抗剂可以采用包括与 $\alpha_v\beta_3$ 相互作用的化合物的各种形式，只要可使与天然 $\alpha_v\beta_3$ 配体的功能性相互作用受到干扰。举证性的拮抗剂包括从 $\alpha_v\beta_3$ 上配体结合位点衍生的 $\alpha_v\beta_3$ 类似物，模拟 $\alpha_v\beta_3$ - 配体结合作用中的结构区的 $\alpha_v\beta_3$ 或 $\alpha_v\beta_3$ 的模拟物，具有对应于 $\alpha_v\beta_3$ 特异性天然配体功能结合区，特别是对应于 $\alpha_v\beta_3$ 天然配体的含 RGD 区之序列的多肽，以及与 $\alpha_v\beta_3$ 或天然配体发生免疫反应的抗体，所有这些均表现出本文所定义的拮抗剂活性。

1 多肽

20 在一个实施方案中，本发明提供了多肽形式的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂。多肽(肽) $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂可含有在与 $\alpha_v\beta_3$ - 配体相互作用区的 $\alpha_v\beta_3$ 天然配体或 $\alpha_v\beta_3$ 自身的特征序列，并表现本文所描述的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂活性。优选的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂肽含有 RGD 三肽并对应于含 RGD 区中天然配体的序列。

25 优选的含 RGD 多肽含有对应于 $\alpha_v\beta_3$ 天然配体如纤维蛋白原，玻璃体结合蛋白，遗传性假血友病因子，层粘连蛋白，血小板反应素等配体之含 RGD 区的氨基酸残基序列。这些 $\alpha_v\beta_3$ 配体的序列是熟知的。因此可以从任何天然配体衍生 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂肽，尽管纤维蛋白原和玻璃体结合蛋白是优选的。

30 特别优选的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂肽与以前描述的其他整合素相比，优先抑制 $\alpha_v\beta_3$ 与其天然配体的结合。这些 $\alpha_v\beta_3$ - 特异性肽是特别优选的，至少是因为 $\alpha_v\beta_3$ 特异性降低了不必要副作用如抑制其他整合素的发生率。在典型的结合抑制试验，如实施例 1 中描述的 ELISA 试验中很容易鉴定具有 $\alpha_v\beta_3$ 选择性的优选的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂肽。

在一个实施方案中，本发明的多肽不超过约 100 个氨基酸残基，优选的不超过约 60 个氨基酸残基，更优选的不超过 30 个氨基酸残基。肽可以是线性的或环状的，但特别优选的是环状的。

在实施例的表 1 中列出了优选的环状和线性肽及其名称。

5 应该理解，所讨论的多肽不必等同于 $\alpha_v\beta_3$ 天然配体的氨基酸序列，只要它包含了所需的序列并且能够在如本文所述的试验中作为 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂而发挥作用即可。

10 只要所讨论的多肽是 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂，那么所述多肽包括其氨基酸残基序列示于本文之多肽的类似物，片段或化学衍生物。因此本发明多肽可以经各种改变，取代，插入和缺失，只要所述改变为其使用提供了特定的优点。从这点看，本发明的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂多肽对应于（而不是等同于）所列举的肽的序列，所述肽有一个或多个改变，但在本文所定义的一个或多个试验中，它保持了作为 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂发挥功能的能力。

15 因此，多肽可以是任何肽衍生物的各种形式，包括酰胺，与蛋白质的结合物，成环的肽，聚合的肽，类似物，片段，化学修饰的肽等衍生物。

20 术语“类似物”包括具有基本上等同于本文具体所示之序列的氨基酸残基序列的任何多肽，其中已经用功能相似的残基保守地取代了一个或多个残基而且它可表现出如本文所示的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂活性。保守取代的实例包括用一个非极性（疏水的）残基如异亮氨酸，缬氨酸，亮氨酸或甲硫氨酸为另一个所取代，在精氨酸和赖氨酸，谷氨酰胺和天冬酰胺，胱氨酸和丝氨酸之间用一个极性（亲水的）残基为另一个所取代，用碱性残基如赖氨酸，精氨酸或组氨酸为另一个所取代或用一个酸性残基如天冬氨酸或谷氨酸为另一个所取代。

25 术语“保守取代”还包括用化学衍生的残基代替非衍生的残基假如这一多肽表现出所需的抑制活性。

30 “化学衍生物”指具有通过功能侧基团的反应而化学衍生的一个或多个残基的多肽。所示衍生的分子包括例如其中游离氨基已被衍生以形成氯化胺，p-甲苯磺酸基，苄酯基，t-丁氧基羰基，氯乙酰基或甲酰基的那些分子。可以衍生游离羧基以形成盐，甲基和乙基酯或其他类型的酯或酰胺。可以衍生游离羟基以形成 O-酰基或 O-烷基衍生物。可以衍生组氨酸的咪唑氮以形成 N-*imbenzyl* 组氨酸。化学衍生物还包括

含有 20 种标准氨基酸的一个或多个天然发生的氨基酸衍生物的那些肽。例如：4-羟基脯氨酸可以取代脯氨酸；5-羟基赖氨酸可取代赖氨酸；3-甲基组氨酸可以取代组氨酸；高丝氨酸可以取代丝氨酸；鸟氨酸可以取代赖氨酸。本发明的代替还包括相对于本文所示的多肽之序
5 列，具有一个或多个残基增加和/或缺失的任何多肽，只要能够保持所需的活性。

术语“片段”指其氨基酸残基序列比本文所示之氨基酸残基序列的多肽短的任何所研究多肽。

当本发明多肽具有不等同于 $\alpha_v\beta_3$ 天然配体之序列的序列时，通常是因为发生了一个或多个保守或非保守取代，通常被取代的氨基酸残基数不超过约 30%，优选的不超过 10%。为了提供“接头”，可将其他残基加到多肽的任一末端，利用所示接头，可以很方便地将本发明多肽固定到标记或固体基质或载体上。
10

下文将描述与本发明多肽一起使用的标记，固体基质和载体。

氨基酸残基接头通常至少一个残基而且也可以为 40 或更多的残基，但经常是 1-10 个残基，但不会形成 $\alpha_v\beta_3$ 配体表位。用作接头的典型氨基酸残基是：酪氨酸，胱氨酸，赖氨酸胱氨酸和天冬氨酸等。此外，除非特别说明，所研究的多肽可以不同于 $\alpha_v\beta_3$ 配体的天然序列，这种不同可以通过 NH_2 末端酰基化如乙酰基化或通过氨基，甲基胺羧基酰胺化巯基乙酸酰胺化，等末端修饰而修饰序列得到的。正如熟知的，末端修饰对于通过蛋白酶消化降低敏感性，因此延长在溶液，特别是蛋白酶可存在的生物学液体中所示多肽的半衰期是有用的。由此可以看出，多肽的环化也是有用的末端修饰方法，而且因为通过环化形成了稳定的结构并对所观察到的所述的环状肽生物学活性是特别优选的。
15
20

可以以药理学可接受的盐的形式使用本发明的任何肽。能够与本发明肽形成盐的适宜的酸包括无机酸如三氟乙酸（TFA）盐酸（HCl），氢溴酸，高氯酸，硝酸，硫氰酸，硫酸，磷乙酸，丙炔酸，乳酸丙酮酸，乙醇酸草酸，丙二酸，琥珀酸，马来酸，富马酸，邻氨基苯甲酸，肉桂酸，萘磺酸，对氨基苯甲酸等。HCl 和 TFA 盐是特别优选的。
25

与本发明肽能够形成盐的适宜碱包括无机碱如氢氧化钠，氢氧化铵，氢氧化钾等；施劳德有机碱如单-，二-和三烷基和芳基胺（如三乙基胺，二异丙基胺，甲基胺，而甲基胺等）和选择性的取代的乙醇胺
30

(如乙醇胺, 二乙醇胺等)。

还可以用本领域专业人员熟知的任何技术, 包括重组 DNA 技术缓冲表位也称为所研究多肽的本发明肽。由于纯度, 抗原特异性, 没有不需的副产物, 容易生产等原因, 合成化学技术, 如固相 Merrifield 型合成法是优选的。许多已有技术的优秀综述见斯台沃德等人, “固相肽合成”, W.H.费曼 Co., 圣弗朗西斯科, 1969; 博丹斯基等人, “肽合成”, 约翰·韦利和逊, 第二版, 1976; J.麦恩霍夫, “激素蛋白和肽”, Vol.2, p.46, 学术出版社, 纽约, 1983; 玛利费尔德, Adv.Enzymol.32:221-96, 1969; 费尔德等人, Int.J. Peptide Protein Res.35:161-214, 1990; 和有关固相肽合成的美国专利申请 4244946, 以及施劳德等人 “肽”, Vol.1, 学术出版社, 纽约, 1965 有关传统的溶液合成, 所有文献均引入本文作为参考。在上述文章 J.F.W.麦克奥米 “有机化学保护基” 普莱纳出版社, 纽约, 1973 (该文献引入本文作为参考) 中描述了在所述合成中可用的保护基团。

15 总之, 所提供的固相合成方法包括顺次加入一种或多种氨基酸残基或适宜保护的氨基酸残基以延长肽链。通常, 第一个氨基酸残基的氨基或羧基由一个适宜的可选择性除去的保护基团加以保护。将一种不同的可选择性除去的保护基团用于含反应性侧基的氨基酸如赖氨酸。

20 用所列举的固相合成法, 将受保护的或衍生的氨基酸通过其未被保护的羧基或氨基连接到惰性固体支持物上。然后选择性地除去氨基或羧基的保护基, 混合有适宜被保护互补 (氨基或羧基) 基团之序列中的下一个氨基酸, 并在适于与已附着于固体支持物上的残基形成酰胺键的条件下反应。然后从新加上的氨基酸残基上除去氨基或羧基的保护基团, 再加入下一个氨基酸 (被适宜保护的), 这样一直下去。在已将所有所需的氨基酸连接在适当的序列中后, 顺次或同时除去任何剩下的末端和侧基团保护基 (和固体支持物) 以得到最终的线性多肽。

25 可以将上述举例的所得线性多肽反应以形成其相应的环状肽。泽莫等人 (Peptides 1992, pp.393-394, ESCOM Science Publishers, B.V., 1993) 描述了使肽成环的举证性方法。通常将叔丁氧基羰基保护的肽甲基酯溶解于甲醇, 加入氢氧化钠溶液, 然后使混合物在 20 °C (20C) 反应以水解除去甲基酯保护基。蒸发掉溶剂后, 用乙酸乙酯从酸 wx 的含水溶剂中提取叔丁氧基羰基保护的肽。然后在二噁烷共溶剂

中，于温和的酸性条件下，除去叔丁氧基条件保护的肽。将如此得到的未保护的有游离氨基和羧基末端的线性肽通过在二氯甲烷和二甲基甲酰胺混合物中，在存在1-羟基苯并三唑和N-甲基吗啉条件下，将所述线性肽的稀释溶液与而环己基碳化二亚胺反应而变成其相应的环状肽。用层析纯化所得的环状肽。

古莱斯等人(欧洲生物化学杂志, 210:911-921(1992))描述了特别优选的环状肽合成方法,且在实施例中也作了描述。在本发明方法中所用的特别优选的肽是c-(GrGDFV)(SEQ ID NO 4),c-(RGDFV)(SEQ ID NO 5),c-(RADfV)(SEQ ID NO 6),c-(RGDFv)(SEQ ID NO 7)和线性肽 YTAECKPQVTRGDVF (SEQ ID NO 8),其中“c-”表示环状肽,大写字母是L-氨基酸的单字母密码,而小写字母是D-氨基酸的单字母密码。这些肽的氨基酸残基序列分别列在SEQ ID Nos 4, 5, 6, 7和8中。

2 单克隆抗体

在一个实施方案中,本发明描述了单克隆抗体形式的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂,所述单克隆抗体与 $\alpha_v\beta_3$ 发生免疫反应并抑制 $\alpha_v\beta_3$ 与本文所述的其天然配体的结合。本发明还描述了产生所述抗体的细胞系,产生所述细胞系的方法,以及生产单克隆抗体的方法。

本发明的单克隆抗体含有1)与分离的 $\alpha_v\beta_3$ 发生免疫反应和2)抑制纤维蛋白原与 $\alpha_v\beta_3$ 结合的抗体分子。优先与 $\alpha_v\beta_3$ 结合的优选的单克隆抗体包括有mAb LM609免疫特征,由杂交瘤细胞系ATCC HB 9537的分泌单克隆抗体。根据布达佩斯条约的要求,杂交瘤细胞系ATCC HB 9537保藏在美国典型培养物收集中心(ATCC), 1301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA, 1987年9月15日。

本文所用的各种语法形式的术语“抗体或抗体分子”作为一个集合名词,指免疫球蛋白分子和/或免疫球蛋白分子的免疫学活性部分的种群,即,含抗体结合位点或互补位的分子。

“抗体结合位点”是抗体分子的结构部分,由特异性结合抗原的重链和轻链的可变和高度可变区组成。

本发明所用的举证性抗体是完整的免疫球蛋白分子,基本上完整的免疫球蛋白分子和含互补位的免疫球蛋白分子部分,包括本领域已知的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，本发明提供了截断的免疫球蛋白分子，所述免疫球蛋白分子由得自本发明单克隆抗体的 Fab 片段组成。不含 Fc 受体的 Fab 片段是可溶的，而且在血清半衰期方面有治疗优势，在使用可溶 Fab 片段的模式方面有诊断优势。可溶 Fab 片段的制备方法通常是免疫学领域熟知的，而且可用各种方法完成。

例如，利用本领域熟知的方法，在基本上完整的抗体上分别通过木瓜蛋白酶和胃蛋白酶的蛋白水解反应制备 Fab 和 F(ab')₂ 部分（片段）。参见例如修弗罗波拉斯和迪森的美国专利 No.4,342,566。Fab' 抗体部分也是熟知的，而且从 F(ab')₂ 片段生产，然后还原连接两个重链部分的二硫键为巯基乙醇，然后用试剂如碘乙酰胺将所得的蛋白质硫醇烷基化。含完整免疫球蛋白分子的抗体是优选的，并在本文中作为说明。

以其各种语法形式的术语“单克隆抗体”指只含有一种抗体结合位点的抗体分子种群，所述抗体结合位点能够与特定表位发生免疫反应，因此，单克隆抗体通常对它所要免疫反应的任何表位表现出单结合亲和性。因此单克隆抗体可含有具有多抗体结合位点的抗体分子，每个抗体结合位点对不同表位是免疫特异性的，如双特异性单克隆抗体。

单克隆抗体通常由称为杂交瘤的单细胞克隆生产的抗体组成，所述单细胞克隆只分泌（生产）一种类型的抗体分子。通过将生产抗体的细胞与骨髓瘤或其他自我永生的细胞系融合而形成杂交瘤细胞。用库勒和米斯腾（自然 256:495-497(1975)，该文献引入本文作为参考）首先描述了所述抗体的制备。其他方法由左拉（*Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc.(1987)）描述。可以筛选所制备的杂交瘤上清液来确定与 $\alpha_v\beta_3$ 免疫反应的抗体分子，并筛选 $\alpha_v\beta_3$ 与天然配体结合的抑制作用。

总之，为了形成从中可生产单克隆抗体组合物的杂交瘤，将骨髓瘤或其他自我维持的细胞系与来自哺乳动物脾的淋巴细胞融合，所述哺乳动物用 $\alpha_v\beta_3$ 源，如从由 Cheresch 等人（*生物化学杂志*.,262:17703-17711(1987)）描述的对 M21 人黑色素瘤细胞分离的 $\alpha_v\beta_3$ 高度免疫。

优选的是用于制备杂交瘤的骨髓瘤细胞系来自与淋巴细胞相同的种。通常，小鼠 129GIX+ 品系是优选的哺乳动物。适用于本发明的小鼠骨髓瘤包括次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷敏感型（HAT）细胞系 P3X63 - Ag8.653，和可从美国典型培养物保藏中心（Rockville, MD）得到的

Sp2/0-Ag14，保藏号分别为 CRL 1580 和 CRL1581。

通常用聚乙二醇（PEG）1500 将脾细胞与骨髓瘤细胞融合。通过其对 HAT 的敏感型来筛选融合的杂交细胞。用在实施例中描述的酶联免疫吸附试验（ELISA）鉴定生产本发明单克隆抗体的杂交瘤。

5 通过起始单克隆杂交瘤培养也可以生产本发明的单克隆抗体，所述单克隆杂交瘤培养包含含有分泌适当特异性抗体分子之杂交瘤的营养培养基。将所述培养保持在一定条件下，并保持足够的时间以使所述杂交瘤将抗体分子分泌到培养基中。然后收集含抗体的培养基。再用熟知的技术分离抗体分子。

10 用于制备中心组合物的培养基是本领域熟知的而且可从商业途径获得，并包括合成的培养基，近亲交配的小鼠等。举证性的合成培养基是用 4.5 mg/l 葡萄糖，20 mM 谷氨酰胺和 20 % 胎牛血清补充的 Dulbecco's 基本培养基（DMEM，Dulbecco 等人，Virol.8:396，1959）。举证性的近亲交配的小鼠株是 Balb/c。

15 产生单克隆抗体，杂交瘤细胞或杂交瘤细胞培养物的其他方法也是熟知的。参见例如，用塞特瑞等人（美国国家科学院院报,86:5728-5732(1989)）和休斯等人（Science 246:1275-1281(1989)）描述的从免疫学所有组成部分分离单克隆抗体的方法。

20 本发明还提供了杂交瘤细胞，含生产本发明单克隆抗体的杂交瘤细胞的培养物。特别优选的是称为 ATCC HB 9537 的分泌单克隆抗体 mAb LM609 的杂交瘤细胞系。按 Cheresch 等人（生物化学杂志,262:17703-17711(1987)）所述制备 mAb LM609，在实施例中描述了其制备。

本发明在一实施方案中提供了具有 mAb LM609 免疫反应特征的单克隆抗体。

25 如果一个单克隆抗体与本发明的单克隆抗体有相同（即等价）的特异性（免疫反应特征），那么不用过分的试验，通过确定前者是否能够防止后者与预选的靶分子结合，就可以确定。如果被试验的单克隆抗体与本发明的单克隆抗体竞争，如在用于结合存在存在固相的靶分子的标准竞争试验中本发明单克隆抗体结合的降低所表明的，有可能两种单克隆
30 抗体与相同的或很接近的表位结合。

确定一种单克隆抗体是否有本发明单克隆抗体特异性的另一种方法是将本发明的单克隆抗体与它通常要与之反应的靶分子预培养，然后

加入待检测的单克隆以确定待试验的单克隆抗体在与靶分子的结合能力方面是否受到抑制。如果在所有可能情况下，待检测的单克隆抗体受到抑制，则它与本发明的克隆抗体有相同或功能等同表位特异性。

5 确定一种单克隆抗体是否有本发明单克隆抗体特异性的另一方法是确定所研究的抗体 CDR 区的氨基酸残基序列。具有等同或功能等同物的抗体分子，在其 CDR 区有有相同的结合特异性。确定多肽序列的方法是本领域熟知的。

10 通过与抗体发生免疫反应的表位，定义抗体的免疫特异性，其靶分子结合能力以及对于表位表现出的抗体的粘附亲和性。用免疫球蛋白抗体重链的可变区的氨基酸残基序列和轻链可变区氨基酸残基序列至少部分确定表位特异性。

术语“具有结合特异性”指等同的单克隆抗体表现相同的或相似的免疫反应（结合）特征，并与预选的靶分子结合竞争。

15 人化的单克隆抗体比鼠单克隆抗体提供了特别的优点，特别是从可以将它们在治疗上用于人。具体地说，人抗体不能象“外源”抗原那样快速地从循环中清除，而且人抗体也不能用与外源抗原和外源抗体相同的方式活化免疫系统。制备“人化”抗体的方法是本领域熟知的，而且可以很容易地用于本发明的抗体。

20 因此，本发明在一个实施方案中提供了通过移植而人化以诱导人免疫系统组分而基本上不干扰抗体与抗原结合能力的本发明单克隆抗体。

3 $\alpha_v\beta_3$ 特异性模拟物

25 本发明表明在本发明中通常可以用 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂，所述拮抗剂包括多肽，抗体和其他分子，称为“模拟物”，它们有干扰 $\alpha_v\beta_3$ 功能的能力。特别优选的特异性干扰 $\alpha_v\beta_3$ 功能而不干扰其他整合素功能的拮抗剂。

30 在本文中认为，只要试剂具有所需的生物学活性，那么各种试剂都可适用于本发明方法。通常将这些试剂称为模拟物，因为它们有能力“模拟”与受体和配体的相互作用功能有关的 $\alpha_v\beta_3$ 或 $\alpha_v\beta_3$ 配体上结合区，由此干扰（即抑制）正常功能。

$\alpha_v\beta_3$ 模拟物是抗体或配体衍生的肽之外的表现出上述特性的任何分子。它可以是肽的合成类似物，形状象上述结合区的结合袋

(pocket) 的化合物, 或其他分子。

用本领域已知的用于药物设计的任何各种结构分析方法包括分子模型, 二维核磁共振 (2 - D NMR) 分析, X - 射线晶体学, 肽的随机筛选, 肽类似物或其他化学聚合物文库等药物设计方法都可以设计 $\alpha_v\beta_3$ 模拟物。

从本发明说明书中所列的广泛的结构迹象看, 这些迹象表明 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂可以是小多肽或单克隆抗体, 共同享有选择性抑制 $\alpha_v\beta_3$ 这一功能特性的两种不同的化学结构, 在本发明方法中有用的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂的结构没有这样的限制, 但包括如本文所定义的任何 $\alpha_v\beta_3$ 模拟物。

10 F 鉴定 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂的方法

本发明还描述了鉴定本发明方法所用的候选 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂的检测方法。在这些检测方法中, 评价候选分子抑制 $\alpha_v\beta_3$ 结合天然配体的潜力, 此外, 再评价它们在组织中抑制血管生成的潜力。

第一个检测方法测量天然配体与 $\alpha_v\beta_3$ 直接结合的抑制作用, 在实施例中详细描述了优选的实施方案。该检测方法用 ELISA 主要测量了天然配体, 如纤维蛋白原与在固相中分离的 $\alpha_v\beta_3$ 结合的抑制程度。

还用该检测方法鉴定表现出 $\alpha_v\beta_3$ 特异性, 但不抑制结合其他整合素的天然配体的化合物。通过跑平行 ELISA 试验来完成特异性检测, 其中在不同的试验小室中同时筛选 $\alpha_v\beta_3$ 和其他整合素与天然配体的结合能力以及候选化合物抑制整合素结合预选配体的能力。在实施例中描述了优选的筛选方法。

第二个试验测量了鸡绒膜尿囊膜 (CAM) 中的血管生成, 并将该试验称为 CAM 试验。已经由其他人详细描述了 CAM 试验, 而且用该试验进一步测量肿瘤组织的血管生成和新血管形成。参见奥旁克等人 (美国病理学杂志, 79:597-618(1975)) 和奥森克等人 (癌症研究, 40:2300-2309(1980)) 。

CAM 试验是用于血管生成的熟知的试验模型, 因为正在发生整个组织的新血管形成, 而且实际的鸡胚胎血管生长到 CAM 中或生长到在 CAM 上生长的组织中。

正如本文所说明的, CAM 试验说明了以新血管生长的量和程度为基础的血管形成。此外, 容易监测移植 CAM 上后任何组织的, 如肿瘤组织的生长。最后, 该试验是特别有用的, 因为在所述试验系统中,

有对毒性的内在对照。将鸡胚胎暴露与任何检测试剂，因此胚胎的健康是毒性的指标。

5 第三个试验体内测量兔眼模型的血管生成，并将其称为兔眼试验。已经由其他人详细描述了兔眼试验，并已用其测量存在血管生成抑制剂如反应停时的血管生成和新血管形成。参见德·奥马托等人（*Proc.Natl.Acad.Sci.*, 91:4082 - 4085(1994)）。

10 兔眼试验是熟知的体内血管生成试验模型，因为通过天然透明的眼角膜很容易观察新血管形成的过程，这是通过兔血管从角膜边缘生长到角膜中而说明的。另外，，在一段时间内很容易监测新血管形成刺激或抑制的量和程度或新血管形成的退化。

最后，将兔暴露于任何试验试剂，因此兔的健康就是试验试剂毒性的指标。

15 第四个试验测量嵌合小鼠：人小鼠模型中的血管生成，变将其称为嵌合小鼠试验。已经由其他人详细描述了该试验，并在本文中作了进一步的描述以测量肿瘤组织的血管生成，新血管形成和退化。参见颜等人（*J.clin.Invest.*91:986-996(1993)）。嵌合小鼠试验是有用的体内血管生成试验模型，因为移植的皮肤移植物在组织学上很类似于正常人皮肤，而且整个组织的新血管正在形成，其中实际的人血管从移植的人皮肤逐渐生长到移植人皮肤表面的人肿瘤组织。通过用人特异性的内皮细胞标记免疫组织化学染色新脉管结构可以说明新血管形成到人移植物中的原点。

20 正如本文所说明，嵌合小鼠试验以新血管生长的退化量和程度为基础，说明新血管形成的退化。此外，该试验很容易监测在移植皮肤后，所移植的任何组织，如肿瘤组织之生长的影响。最后，由于在所述试验系统中，有对毒性的内在对照，所以该试验是有用的。将嵌合小鼠暴露于任何试剂，因此所述小鼠的健康是毒性的指标。

实施例

30 与本发明有关的下列实施例是说明性的，当然不应解释为对本发明的具体限制。此外，本领域专业人员范围内的本发明的所述改变，现在的或以后发展的，都被认为在下文所要求的本发明的范围内。

1 制备合成肽

用标准固相合成技术如由 Merrifield（*酶学进展*, 32 : 221 -

96 , (1969)) 和 Fields ,G.B. and 诺博 ,R.L. (国际肽蛋白研究杂志,35:161-214(1990)) 描述的, 合成了表 1 中所列的现象和环状的多肽。

5 将 2 克(g) BOC-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-OMe(SEQ ID NO 1) 溶解在 60 毫升 (ml) 甲醇中, 向其中加入 1.5 ml 2N 氢氧化钠以形成混合物。然后在 20 °C (20C) 将混合物搅拌 3 小时。蒸发后, 用水溶解残留物, 用 HCl 酸化到 pH3, 然后用乙酸乙酯提取。在 Na₂SO₄ 上干燥提取物, 再蒸发, 将所得的 BOC-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-OH(SEQ ID NO 2) 在 20 °C 与 20 ml 二噁烷中的 2N HCl 一起搅拌 2 小时。蒸发所得的混合物以得到 H-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-OH(SEQ ID NO 3), 10 随后将其溶解在 1800 ml 的二氯甲烷和 200 ml 二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 然后冷却到 0 °C。此后, 连续地加入 0.5g 二环己基碳化二亚胺 (DCCI), 0.3 g 1 - 羟基苯并三唑 (HOBt) 和 0.23 ml N - 甲基吗啉, 同时搅拌。

15 在 0 °C 将所得的混合物搅拌再 24 小时, 在 20 °C 再搅拌 48 小时。浓缩溶液, 用混合的离子交换床处理以使它不含盐。通过过滤除去所得的树脂后, 蒸发澄清的溶液, 用层析纯化残留物以回收环 (Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val) (SEQ ID NO 4)。类似地可以得到表 1 中单字母密码子氨基酸残基缩写所列的并由肽数字命名标明的下列肽: 环 (Arg-gly-Asp-D-Phe-Val) (SEQ ID NO 5); 环 (Arg-Ala-Asp-D-Phe-Val) (SEQ ID NO 6); 环 (Arg-D-Ala-Asp-Phe-Val) (SEQ ID NO 9); 环 (Arg-Gly-Asp-Phe-D-Val) (SEQ ID NO 7)。命名为 66203 的肽含有等同于肽 62184 的序列, 唯一的不同仅在于后者含盐 HCl 而不是在 62184 中存在的 TFA 盐。在实施例 7 中描述的使用合成肽的血管生成抑制试验中, 含有 HCl 的肽 66203 在抑制血管生成中比 25 TFA 中的相同肽的效力略好。

表 1

<u>肽号</u>	<u>氨基酸序列</u>	<u>SEQ ID NO</u>
62181	cyclo(GrGDFV)	4
62184	cyclo(RGDfV)	5
62185	cyclo(RADFV)	6
62187	cyclo(RGDFV)	7
62880	YTAECKPQVTRGDV	8

F

62186	cyclo(RaDFV)	9
62175	cyclo(ARGDfL)	10
62179	cyclo(GrGDfL)	11
62411	TRQVVC DLGNPM	12
62503	GVVRNNEALARLS	13
62502	TDVNGDGRHDL	14

*小字母表示 D - 氨基酸;

大写字母表示 L - 氨基酸。

命名为 69601 的肽含有与肽 62185 相同的序列, 唯一的不同是后者含盐 HCl 而不是在 62184 中存在的 TFA 盐。

已经表明环肽 c-RADfV (69601) 抑制纤维蛋白原与整合素 $\alpha_v \beta_3$ 的结合, 但不抑制纤维蛋白原与整合素 $\alpha_{IIb} \beta_3$ 或 $\alpha_5 \beta_1$ 的结合(费福, 等人, 生物化学杂志., 269:20233-20238, 1994)。因此, 肽 c-RADfV 是 $\alpha_v \beta_3$ 特异性的。

10 2 单克隆抗体

用吸附到 Sepharose-lentil 外源凝集素珠上的分离的 $\alpha_v \beta_3$ 进行免疫, 用标准杂交瘤方法生产由杂交瘤 ATCC HB 9537 分泌的单克隆抗体 LM609。从命名为 M21 的人黑色素瘤细胞中已经分离的了 $\alpha_v \beta_3$, 并按 Cheresh 等人 (生物化学杂志., 262:17703-17711(1987)) 所述生产了抗体。用 Dr.D.L. 莫顿 (加州大学洛杉矶分校, CA) 提供了 M21 细胞, 并使其在含 2mM L-谷氨酰胺, 50 mg/ml 硫酸艮他霉素和 10 % 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中的悬浮液中生长。

已经表明单克隆抗体 LM609 与 $\alpha_v \beta_3$ 复合物有特异性地免疫反应, 但不与 α_v 亚单位, β_3 亚单位或其他整合素发生免疫反应。

20 3 表征 $\alpha_v \beta_3$ 表达的组织分布

A 与抗 - 整合素受体抗体的免疫荧光

在伤口愈合过程中, 血管的基膜表达数种粘附蛋白质, 包括遗传性假血友病因子, 纤维结合素和纤维蛋白。另外, 在培养的平滑肌和内皮细胞的表面上表达粘附受体整合素家族的数个成员。参见 Cheresh, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84: 6471 (1987), Janat 等人, 细胞生理学杂志

151: 588 (1992); 和 Cheng 等人细胞生理学杂志 139: 275 (1989)。在这些中, 整合素是 $\alpha_v\beta_3$, Cheresh, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84:6471(1987) 所述的遗传性假血友病因子, 纤维蛋白原 (纤维蛋白) 和纤维结合素的内皮细胞受体。所述整合素起始导致内皮细胞迁移的钙依赖性的信号途径, 因此, 所述整合素在莱维思等人细胞生理学杂志, 121:163(1993) 所述的血管细胞生物学中起基本作用。

5 为了研究在血管生成过程中 $\alpha_v\beta_3$ 的表达, 从同意的患者中得到人伤口肉芽组织或相邻的正常皮肤, 用 1 ml 的磷酸合成的盐洗涤并植入 O.T.C 培养基 (Tissue Tek) 中。将植入的组织迅速在液氮中冷冻约 30
10 - 45 秒。在低温恒温箱检镜用薄刀切断器上, 从冷冻块上切出 6 微米厚的切片, 然后用 β_3 整合素 ($\alpha_v\beta_3$ 或 $\alpha_{IIb}\beta_3$) 或整合素的 β_1 亚家族特异性的抗体进行免疫过氧化物酶染色。

在图 1A - 1D 中出示了正常人皮肤和伤口肉芽组织的染色结果。分别用对 β_3 和 β_1 整合素的单克隆抗体 AP3 和 LM534 对冷冻切片进行
15 免疫组织化学分析。用四中不同的人供体的组织进行试验, 得到了相同的结果。将显微相片放大 300X。

$\alpha_v\beta_3$ 整合素在肉芽组织的血管上有很丰富的表达 (图 1B), 但在来自相同供体的正常皮肤表皮和内皮中则是不可检测 (图 1A)。相反, 在正常皮肤 (图 1C) 和肉芽组织 (图 1D) 的血管和基质细胞中
20 均表达了丰富的 β_1 整合素, 而且在内皮的基细胞上, 与以前艾德姆等人 (细胞, 63:425(1991)) 描述的一样。

B 用抗-配体抗体的免疫荧光

在存在 β_3 和 β_1 整合素, 遗传性假血友病因子和层粘连蛋白配体的条件下, 分别检测上述制备的其他人正常皮肤和肉芽组织。遗传性假
25 血友病因子定位于正常皮肤 (图 2A) 和肉芽组织 (图 2B) 的血管, 而层粘连蛋白位于所有血管以及两种组织制品的内皮基膜 (图 2C 和 2D) 上。

C 抗 $\alpha_v\beta_3$ 抗体在癌组织上的分布

除上述分析外, 还检测了来自人患者癌症组织活检的 $\alpha_v\beta_3$ 存在
30 和分布的情况。按实施例 1A 所述制备组织, 除用实施例 2A 中制备的单克隆抗体 LM609 染色外, 所述抗体是整合素复合物 $\alpha_v\beta_3$ 特异性的。此外, 通过将肿瘤的代表性实例在 Bulins Fixative 固定 8 小时, 然

后连续切片并进行 H&E 染色而制备用于显微组织分析的肿瘤。

在图 3A - 3D 中列出了膀胱, 结肠乳腺和肺癌组织的免疫过氧化物酶染色结果。在四种分析的癌活检中, 仅在血管中表达了丰富的 $\alpha_v\beta_3$, 但在所述组织的其他任何细胞中均没有。

5 因此本文描述的结果表明, $\alpha_v\beta_3$ 整合素受体在特定类型的组织, 即肉芽化的, 转移组织或其中有血管生成的其他组织或性血管形成已经停止的不正常组织中选择性地表达。因此这些组织为本发明的治疗提供了理想的靶。

4 鉴定通过配体 - 受体结合试验检测的 $\alpha_v\beta_3$ 特异性合成肽

10 通过在纯化的配体 - 受体结合试验中, 测量其对抗 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 受体结合或的能力, 来筛选实施例 1 中制备的合成肽。已经由巴贝斯等人 (Proc.Natl.Acad .Sci.,USA,90:10003-10007(1993)) 和费福等人 (生物化学杂志.,269:20233-20238(1994)) (所述内容均引入本文作为参考) 描述了进行这些结合研究的方法。

15 本文描述的是在配体 - 受体结合试验中鉴定拮抗剂的方法, 其中所述受体被固定了固体支持物上, 而所述配体和拮抗剂是可溶解的。还描述了配体 - 受体结合试验, 其中所述配体被固定在固体支持物上, 而受体和拮抗剂是可溶的。

20 总而言之, 以每孔 50 ng 的包被浓度, 将所选的纯化整合素分别固定在 Titertek 微滴定孔中。所配体 - 受体结合试验中所用的受体的纯化方法是本领域熟知的, 而且用本领域专业人员熟知的方法很容易得到。在 4 °C 保温 18 小时后, 用在 Tris - 缓冲盐中的 10 mg/ml 牛血清白蛋白阻断平皿上非特异性结合的位点。为了进行抑制研究, 试验从表 1 中所选的各种浓度肽阻断 ^{125}I - 玻璃体结合蛋白或 ^{125}I - 纤维蛋白原与整合素受体 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 结合的能力。尽管这些配体对特定整合素, 玻璃体结合蛋白对 $\alpha_v\beta_3$ 和纤维蛋白原对 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 表现出最佳的结合, 但利用肽阻断纤维蛋白原与任一受体结合的结合抑制可以以微摩尔 (μM) 精确地确定半最大抑制受体与配体结合所需的肽量。以 1 nM 的浓度使用放射性标记的配体, 用未标记的合成肽分别攻击结合。

30 保温 3 小时后, 通过洗涤除去游离的配体, 有 γ 计数检测结合的配体。来自所述试验的数据以低于 11 % 的误差是高度可重复的, 在所述试验中, 用表 1 中所列的环肽抑制与分别固定的 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 受

体结合的受体和放射性标记的纤维蛋白原。在表 2 中，将微摩尔 IC_{50} 表示为两份数据的平均值 \pm 标准误差。

表 2

肽号	$\alpha_v \beta_3$ ($IC_{50}\mu M$)	$\alpha_{IIb} \beta_3$ ($IC_{50}\mu$)
62181	1.96 \pm 0.62	14.95 \pm 7.84
62184	0.05 \pm 0.001	0.525 \pm 0.10
62185	0.885 \pm 0.16	100 \pm 0.001
62187	0.05 \pm 0.001	0.26 \pm 0.056
62186	57.45 \pm 7.84	100 \pm 0.001
62175	1.05 \pm 0.07	0.63 \pm 0.18
62179	0.395 \pm .21	0.055 \pm 0.007

因此，含 RGD 或 RGD 衍生的环肽 62181，62184，62185 和 62187
 5 (各带有一 D - 氨基酸残基) 优先抑制纤维蛋白原与 $\alpha_v \beta_3$ 受体的基
 因，达到半最大抑制所需的肽浓度低于 $\alpha_{IIb} \beta_3$ 所需的浓度。相反，其
 他含 RGD 或 RGD 衍生的环肽，62186，62175 和 62179 对于阻断纤维
 蛋白原与 $\alpha_v \beta_3$ 没有效果，或与 $\alpha_v \beta_3$ 相比，并不优先抑制纤维蛋白
 原与 $\alpha_{IIb} \beta_3$ 的结合。这些结果与最近由费福等人 (生物化学杂
 10 志.,269:20233-20238(1994)) 公开的结果一致，费福等人公开的结果是环
 肽 RGDFV (其中 F 表示 D - 氨基酸) 特异性地抑制纤维蛋白原与 α_v
 β_3 的结合，但不抑制与 $\alpha_{IIb} \beta_3$ 或 $\alpha_5 \beta_1$ 整合素的结合。用带有或不
 含 RGD 基元的线性肽延长相似的结合抑制试验，其序列来自 α_v 受体
 亚单位， α_{IIb} 受体亚单位或玻璃体结合蛋白配体氨基酸残基序列。表 1
 15 中列出了线性肽 62880 (VN - 衍生的氨基酸残基 35 - 49)，62411
 (α_v - 衍生的氨基酸残基 676 - 687)；62503 (α_v - 衍生的氨基
 酸残基 655 - 6676) 62502 (α_{IIb} 衍生的氨基酸残基 296 - 306)。
 在不同的试验中使用这些肽以抑制玻璃体结合蛋白 (VN) 或纤维蛋白
 原 (FG) 与 $\alpha_{IIb} \beta_3$ 或 $\alpha_v \beta_3$ 的结合。表 3 中类出了每个试验的 IC_{50}
 20 的微摩尔 ($IC_{50} \mu M$) 值。

表 3

肽号	$\alpha_{IIb} \beta_3$ ($IC_{50}\mu$)		$\alpha_v \beta_3$ ($IC_{50}\mu M$)	
	FG	VN	FG	VN
62880	4.2	0.98	<0.1	0.5

62411	>100	>100	>100	>100
62503	>100	>100	>100	>100
62502	90	5	>100	>100

整合素受体与线性化肽的配体结合抑制试验的结果表明，只有肽 62880 在 FG 或 VN 与 $\alpha_v \beta_3$ 的半最大结合的抑制中是有效的，而半最大抑制所需的肽浓度低于 $\alpha_{IIb} \beta_3$ 所需的。其他线性化肽均不能有效地
5 阻断配体与 $\alpha_v \beta_3$ 的结合，尽管肽 62502 可以有效地阻断 VN 与 $\alpha_{IIb} \beta_3$ 的结合。

因此，可以用本文所述的配体 - 受体试验筛选有特定整合素受体特别是 $\alpha_v \beta_3$ (当在实施本发明时，用作玻璃体结合蛋白受体 ($\alpha_v \beta_3$) 拮抗剂时，选择特异性的环状或线性合成肽。

10 5 表征未处理的鸡绒膜尿囊膜 (CAM)

A 制备 CAM

在正常胚胎血管生成导致形成成熟血管后，可以在鸡绒膜尿囊膜 (CAM) 上诱导血管生成。正如由雷博威治等人 (自然, 329:630(1987)) 和 Ausprunk 等人 (A.m.J.Pathol., 79:597(1975)) 所描述的，诱导血管
15 生成以应答特定细胞因子或肿瘤片段。从鸡胚胎制备 CAMs，然后按实施例 6 和 7 中所述诱导并抑制血管生成。从麦克因泰禽类购得 (Lakeside, CA) 达到 10 天龄的鸡胚胎，然后在 37 °C，60 % 的湿度保温。用小手工钻 (Dremel, Division of Emerson Electric Co. Racine WI) 在鸡旦空气囊上的那端，穿过壳作一小孔。在通过用烛光照鸡旦后确定没有胚胎血管的区域内，在鸡旦宽的一侧钻第二个孔。将负压力用于开始的孔，使 CAM (绒膜尿囊膜) 从壳膜拉开，并在 CAM 上得到一假空气囊。用小型磨轮 (Dremel) 在拉出的 CAM 上穿过壳，切一 1.0cm
20 × 1.0cm 的窗口。小窗口可以直接到达下面的 CAM。

然后在胚胎生成 6 天 (以活性新血管形成为标记的阶段) 使用所得
25 的 CAM 制品，而不需再处理 CAM 反映用于评价对胚胎新血管生成学影响的模型，或在血管生成已经减少的胚胎生成 10 天使用所述 CAM 制品。因此实施例 6 中所述，在本发明中使用后一种制品以重新诱导血管生成以应答细胞因子处理或肿瘤接触。

B CAM 的组织学

按实施例 8 所述, 为了分析从鸡胚胎中切除的鸡胚胎 CAM 和/或人肿瘤的显微结构, 按实施例 3A 中所述, 制备 CAM 和肿瘤冷冻切片。在低温恒温箱检镜用薄刀切断器上从冷冻块上切出 6 微米厚的切片用于免疫荧光分析。

5 图 4 表示未处理的 10 天龄 CAM 中, 没有血管区域的典型显微照片。由于在 CAM 系统中, 血管生成因该阶段的胚胎生成而逐渐衰退, 所以在本发明中该系统可用于从相邻区域现存的血管刺激新脉管结构产生, 进入目前没有任何血管的 CAM 区域。

C 整合素在用免疫荧光检测的 CAM 中的图形

10 为了研究 CAM 组织中整合素受体的组织分布, 将 6 微米(μM)的肿瘤组织和鸡胚胎 CAM 组织的冷冻切片在丙酮中固定 30 秒, 然后用 10 $\mu\text{g/ml}$ mAb CSAT, 按巴克等人(J.细胞 Biol.107:2351(1988))所述, 是 β_1 整合素亚单位特异性的单克隆抗体, 因此用作对照, 或实施例 2 中制备的 LM609 通过免疫荧光染色。在初次染色后用 1: 250 稀释的山羊抗 - 小鼠若丹明标记的二级抗体 (Tago) 染色以便检测初级免疫反应产物。然后用蔡斯免疫荧光化合物显微镜分析所述切片。

15 免疫荧光分析的结果表明在表达整合素 β_1 亚单位的未处理的 10 天龄鸡胚胎中, 存在成熟的血管 (图 5A)。相反, 在图 A 中所示的一系列组织切片中没有表明与 LM609 有免疫反应 (图 5B)。因此, 在 10 天龄未处理的鸡胚胎中存在的成熟血管并未活性表达由 LM609 抗体检测的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 。正如在 CAM 模型和在下列实施例中所示, 在正常胚胎生成中有新的血管生长或由细胞因子或肿瘤诱导时, 血管表达 $\alpha_v\beta_3$ 。但是, 在活性新血管形成后, 一旦血管停止发育, $\alpha_v\beta_3$ 的表达就降低到用免疫荧光分析不可检测的水平。在经历血管生成的血管中 $\alpha_v\beta_3$ 表达的这种调节与在成熟血管中没有表达形成对照, 它为本发明提供了控制并抑制在下列实施例中所示的血管生成的特有能力和题目它们是用 CAM 血管生成检测系统作为模型的。

6 CAM 血管生成检测

A 用生长因子诱导的血管生成

30 按实施例 5A 中说明的, 用细胞因子或生长因子可以诱导血管生成。在本文所述的试验中, 用生长因子诱导在实施例 5 中所述 CAM 制品中的血管生成, 所述生长因子按本文所述局部施用到 CAM 血管中。

将 5 mm × 5 mm 用 Hanks 平衡的盐溶液 (HBSS , GIBCO,Grand Island,NY) 或含 150 ng/ml 重组碱性成纤维细胞生长因子 (β FGF) (Genzyme, Cambridge ,Ma) 的 HBSS 饱和的 Whatman 滤纸片 (Whatman 滤纸 1 号) 放在没有血管区域的 10 天龄鸡胚胎上, 然后用胶带密封窗口。在其他试验中, 125 ng/ml β FGF 对于诱导血管生长也是有效的。在 72 小时后, 提供显微照片监测血管生成。迅速冷冻 CAM, 用丙酮固定 6 μ M 的低温恒温切片, 然后按实施例 5C 所述, 用 10 ug/ml 抗 - β_1 单克隆抗体 CSAT 或 LM609 免疫荧光染色。

图 5C 中的免疫荧光照片表明 CAM 上 β FGF 诱导的血管生成过程中, $\alpha_v\beta_3$ 的表达提高, 与图 5B 中所示的在未处理鸡 CAM 中没有 $\alpha_v\beta_3$ 表达的情况相反。在 β FGF - 处理的 CAM 的许多 (75 % - 80 %) 血管中, $\alpha_v\beta_3$ 均是很容易检测的。另外, 由于 β_1 在刺激过的血管中很容易检测到, 所以在未处理的 CAM 中并未发现整合素 β_1 表达的变化。

然后通过 CAM 低温恒温切片的激光共聚焦图像分析来定量分析在 β FGF - 诱导的血管生成过程中, $\alpha_v\beta_3$ 和 β_1 整合素的相对表达。用 Zeiss 激光共聚焦显微镜分析染色的切片。从随机视野中选择 25 个用 LM609 染色的和 15 个用 CSAT 染色的血管 (平均大小 $\sim 1200 \text{ mm}^2$, 范围在 $350 - 3500 \text{ mm}^2$), 通过激光共聚焦图像分析以任意单位测量每单位面积各血管的平均若丹明荧光。将数据表示为血管任意单位的平均荧光强度 \pm 标准误差 (SE) 。

图 6 中的结果表明通过 Wilcoxon Rank Sum 试验 ($P < 0.0001$) 确定, 在用 β FGF 处理的 CAM 上, $\alpha_v\beta_3$ 染色明显提高 (高 4 倍), 而用 β FGF 处理, β_1 染色没有显著的不同。

还用 CAM 试验进一步检测另一种潜在血管生成诱导剂, 肿瘤坏死因子 - α (TNF α) 对 β_1 和 β_3 整合素的影响。 β FGF 或 TNF α 浸润滤纸片, 并将其放在来自 10 天胚胎的 CAM 上, 发现在 72 小时后, 促进局部的血管生成。

未处理的 (图 7A), 用 β FGF 处理的 (图 7B) 或用 TNF α 处理的 (图 7C) CAM 的显微照片中表明了这些结果。在 β FGF 和 TNF α 处理的制品中, 血管是很明显的, 但在未处理的 CAM 中则没有。因此, 局部施用生长因子/细胞因子会诱导从相邻区域的成熟血管生成到原

来没有血管的区域中。如在图 5C 中所示，从 β FGF - 诱导的血管和 $\alpha_v \beta_3$ 的伴随表达来看，TNF α 处理会导致可比的活性。

5 这些发现表明，与血管生成有关的人和鸡血管中， $\alpha_v \beta_3$ 的表达增加。与此相一致，用如詹纳特等人 (J.细胞 Physiol.151:588(1992))；
艾伦斯坦等人 (实验细胞学研究, 203:499(1992)) 和斯沃里克等人 (J.Invest.Derm.99:715(1993)) 所述，通过各种细胞因子可以体外诱导在培养的内皮细胞上的 $\alpha_v \beta_3$ 的表达。

在实施例 7A 和 7B 中说明了抗体和肽抑制剂对生长因子诱导的血管生成的影响。

10 B 胚胎血管生成

如前所述，用于评价血管生成抑制剂对天然胚胎新脉管结构形成的影响的 CAM 制品是 6 天龄的鸡胚胎。在该发育阶段，血管正在经历重新生长，因此提供了用于确定 $\alpha_v \beta_3$ 是否参与胚胎血管生成的有用系统。按上述制备 CAM 系统，除试验是在 6 天胚胎而不是 10 天胚胎完成。
15 在实施例 7C 中说明了本发明抗体和肽处理后，对胚胎血管生成的影响。

C 由肿瘤诱导的血管生成

为了研究 $\alpha_v \beta_3$ 在肿瘤诱导的血管生成中的作用，在 CAM 试验中使用各种 $\alpha_v \beta_3$ 阴性人黑色素瘤和癌片段，所述片段是按 Brooks 等人
20 (J.细胞 Biol.,122:1351(1993)) 所述从 17 天龄的鸡胚胎的 CAM 中生长并分离的。所述片段在只存在缓冲液的条件下诱导强新血管形成。

在 CAM 试验中，通过将肿瘤片段直接放在 CAM 上就可诱导血管生成。鸡胚胎 CAM 的制备与上述相同。代替滤纸片，将 50 mg-55mg 重的人黑色素瘤肿瘤 M21L，人肺癌肿瘤 UCLAP - 3，人胰腺癌细胞系 FG (Cheresh et al.,细胞 58:945-953,1989) 之一的片段，所有这些
25 片段均是 $\alpha_v \beta_3$ 阴性肿瘤，放在 CAM 上原来没有血管的区域中。

用 M21L 人黑色素瘤细胞系，UCLAP - 3 人肺癌细胞系，FG 胰腺癌细胞系或 HEp3 人喉癌细胞系 (所有均是 $\alpha_v \beta_3$ 阴性) 在鸡胚胎的 CAM 上生长实体人肿瘤。首先将 8×10^6 M21 - L，UCLAP - 3
30 和 FB 或 5×10^5 HEp3 细胞用于 CAM，总体积为 30 ul 的灭菌 HBSS。用胶条将窗口密封上，将所述胚胎保温 7 天以使人肿瘤损伤生长。在 7 天末，现在是 17 天胚胎，从 CAM 上切下肿瘤，剥去 CAM 周围的组织。

将肿瘤切成 50 mg-55mg 的肿瘤片段以便用于血管生成或肿瘤生长试验。将肿瘤片段放在按实施例 6A 中所述的一组新 10 天龄的鸡胚胎 CAM 上没有血管的区域中。

按实施例 3A 所述，用 mAb LM609 将在鸡胚胎 CAM 上体内生长的肿瘤染色，来检测 $\alpha_v\beta_3$ 表达。没有观察到肿瘤细胞的特异性染色，表明没有 $\alpha_v\beta_3$ 表达。

然后按实施例 7D 和 7E 所述处理这些 CAM 肿瘤制品，以测量抗体和肽对肿瘤诱导的血管生成的影响。还按实施例 8，9 和 12 所述处理 CAM 肿瘤制品，以变量抗体和肽对肿瘤退化以及血管生成中的血管和血管细胞细胞凋亡的影响。

7 在 CAM 试验中测量血管生成的抑制作用

A 通过局部施用抑制剂来抑制生长因子诱导的血管生成

1) 用单克隆抗体处理

为了确定 $\alpha_v\beta_3$ 是否在血管生成中起活性作用，将用 β FGF 或 TNT α 饱和的滤纸片放在 CAM 上，然后将单克隆抗体（也称为 mAb），LM609（ $\alpha_v\beta_3$ 特异性的），CSAT（ β_1 特异性的）或 P3G2（ $\alpha_v\beta_5$ 特异性的）加到所述制品中。

通过用 β FGF 饱和的滤纸片在来自 10 天鸡胚胎的 CAM 上诱导血管生成。然后在 0，24 和 48 小时，用 50 ml 含 25 mg 总体积为 25 ul 灭菌 HBSS 的 mAb 的 HBSS 处理所述圆片。在 72 小时，收集 CAM，并将其放在 35 mm 培养皿中，用 1 ml 磷酸缓冲的盐洗涤一次。然后在奥扑巴斯立体显微镜下，用双盲方式观察镜分析滤纸和底面和 CAM 组织。当直接在圆片下的 CAM 浸润降低了 >50% 以上，则认为血管生成抑制是明显的。将每抗体，每种条件 6 - 7 个胚胎重复 4 次试验。

在图 8A - 8B 中说明了 mAb 处理对 β FGF 诱导的血管生成影响的结果。在图 8A 中表明，未处理的 CAM 制品没有血管，这与图 8B 中 β FGF 血管诱导作用形成了对比，在图 8C - 8E 中说明了 mAbs 的影响。在图 8E 中表明，用 mAb LM609 处理的约 75 % 的这些 CAM 对血管生成的抑制作用有 >50% 的降低，其中许多没有血管浸润。相反，缓冲液对照（图 8A）和用 mAbs CSAT（图 8C）和 P3G2（图 8D）处理的圆片一致地表明了强新血管形成。

用 TNT α 诱导时，得到了相同的结果。为了检验这些相同抗体对

已存在的成熟血管的影响，所述成熟血管从正常血管发育到相邻的没有血管的区域，将用 mAbs 饱和的滤纸片放在来自 10 天胚胎 CAM 的并未局部施用细胞因子的维管化区域上。用立体显微镜观察评价，三种 mAbs 没有一种影响现存的血管。因此，mAb LM609 只选择性地一致新血管生长，而不影响在相邻区域中存在的成熟血管。按实施例 7A2)和 7E2)所述，分别局部或静脉内施用合成肽可以得到相同的结果。

2) 用合成肽处理

再用本发明的合成肽完成 CAM 施用以确定环和线性肽对生长因子诱导血管生成的影响。按实施例 1 所述制备所述肽，在 25 ul 总体积的灭菌 HBSS 中存在 80 ug 肽。将所述肽溶液用于即时制备的 CAM 中，然后再在 24 和 48 小时时施用。在 72 小时，切开滤纸和 CAM 周围的组织，按上述进行观察。

来自该试验的结果表明与在实施例 7E2)中描述的，在图 9A - 9C 中所示的相似，其中将合成肽静脉内注射到肿瘤诱导的血管中。在此，用对照肽，62186， β FGF 诱导的血管如图 9A 所示，保持原样。相反，当将环 RGD 肽，62184 用于滤纸时，血管形成受到抑制，剩下没有新脉管结构的区域。这一影响看起来与下文实施例 7E2)中描述的，图 9B 中所示的相似。另外，在图 9C 中还出示了静脉内注射肽的结果，在已存在成熟血管，但远离放生长因子饱和的滤纸的区域中，局部施用合成肽对这些周围血管没有影响。因此，所述肽对血管生成的抑制活性限于由生长因子诱导的血管生成区域，但不会影响相邻的已存在的成熟血管或对周围区域产生任何后害影响。

用实施例 1 中制备的并在表 1 中所列的其他合成肽完成相似的试验。

25 B 通过静脉内施用抑制剂来抑制生长因子诱导的血管生成

1) 用单克隆抗体处理

还要评价静脉内注射到 CAM 制品中的单克隆抗体对生长因子诱导的血管生成的影响以用于本发明。

主要按实施例 7A 所述，稍微作些修改，来制备用于静脉内注射的鸡胚胎 CAM。在光照的过程中，选择显著的血管，并在蛋壳上作标记以标明其位置。在壳上钻小孔，取出 CAMs 并按上述将 β FGF 饱和的滤纸放在 CAMs 上。用消毒胶条密封窗口，然后将胚胎放在保温箱中。

24 小时后，在蛋壳的侧面，以前所选的显著血管的正上方仔细切第二个小窗口。仔细除去外层蛋壳，剩下完整的胚胎膜。用小滴矿物油（Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT）使壳膜透明，这样容易观察到血管。将纯化的 无菌 mAb 或合成肽（将在下文描述）直接接种到血管中，
5 一次用 30 号针头，剂量为在 100 ul 消毒 PBS 中每胚胎 200 ug IgG。用胶条将窗口密封，将胚胎保温 72 小时。按上述分析滤纸片和 CAM 周围的组织。

为了确定 LM609 mAb 在 CAM 组织或肿瘤组织中的位置，按本节和下文实施例所述，所述两种组织先用 LM609 静脉内接种，用在 HBSS
10 中的 2.5% BSA 在室温将固定的切片阻断 1 小时，然后用 1: 250 稀释的山羊抗 - 小鼠若丹明标记的第二抗体（Tago）染色。然后用蔡斯免疫荧光化合物显微镜分析切片。

在图 10A - 10C 中说明了静脉内抗体处理 β FGF 诱导的血管 CAM 制品的结果。在图 10A 中，说明了作为 β FGF 处理之结果的诱导的血管生成。如图 10B 中所示，静脉内暴露于 mAb P3G2，一种抗 - $\alpha_v \beta_5$
15 抗体，对 β FGF 诱导的维管结构没有影响。相反，如图 10C 所示，用 LM609（一种抗 $\alpha_v \beta_3$ 抗体）处理 β FGF 诱导的血管生成 CAM 制品会完全抑制新血管生长到滤纸区。因此对血管生成的抑制作用是起因于 LM609 抗 - $\alpha_v \beta_3$ - 特异性抗体抑制了 $\alpha_v \beta_3$ 受体活性。由于 $\alpha_v \beta_5$
20 的阻断不会抑制新脉管结构形成到 CAMs 滤纸位点，所以 $\alpha_v \beta_5$ 与 $\alpha_v \beta_3$ 相比，对于新血管的生长不是必需的。

2) 用合成肽处理

将实施例 1 中制备的合成肽分别静脉内注射到上述 CAM 制品中生长因子诱导的血管中。相似地评价所述肽对血管生命力的影响。

25 C 局部施用抑制胚胎血管生成

1) 用单克隆抗体处理

为了确定 $\alpha_v \beta_3$ 是否参与胚胎血管生成，在 6 天胚胎（按实施例 5A 中所述，以活性新血管形成为标志的阶段）中，检测 LM609 对 CAMs 上重新生长的血管的影响。按实施例 6C 所述制备 CAM 检测，在没有
30 细胞因子的条件下，将用 mAb 饱和的圆片局部施用到 6 天龄胚胎的 CAMs 上。3 天后，切下 CAMs 并拍照。每个试验每组包含 6 个胚胎，重复 2 次。

在这些条件下，抗体 LM609（图 11C），但不是 CSAT（图 11A）或 P3G2（图 11B）抑制血管生长；这表明 $\alpha_v\beta_3$ 在胚胎新血管形成中起重要作用，与诱导血管生成的加入的生长因子无关。

2) 用合成肽处理

- 5 通过局部施用到 CAM 中或静脉内施用到血管中，将实施例 1 中制备的合成肽分别加到上述和实施例 5A2) 中所述制备的胚胎 CAM 制品中。相似地评价所述肽对血管生命力的影响。

D 通过局部施用抑制肿瘤诱导的血管生成

1) 用单克隆抗体处理

- 10 除评价上述抗 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂，LM609 和肽 62181，62184，62185，62187 和 62880 对胚胎血管生成的血管生成施用外，还研究了 $\alpha_v\beta_3$ 在肿瘤诱导的血管生成中的作用。作为一种诱导剂，使用从 17 天鸡胚胎的 CAM 中生长并分离的 $\alpha_v\beta_3$ - 负人 M21 - L 黑色素瘤片段。按实施例 6 所述制备所述片段。

- 15 按上述实施例 7A1) 中所述，分别将 mAb 局部施用到肿瘤片段，施用浓度为在 25 ul HBSS 25ug 并用胶条密封窗口。在 24 小时和 48 小时以相同的方式再加入 mAb。在 72 小时，按实施例 7A1) 所述分析肿瘤和 CAM 周围的组织。

- 20 按实施例 6C 所述，通过移植培养的 M21 - L 细胞于 10 天龄的鸡胚胎上，开始衍生肿瘤，按 Felding-Habermann 等人（J.Clin.Inwest., 89:2018（1992））所述，该细胞不表达整合素 $\alpha_v\beta_3$ 。这些 $\alpha_v\beta_3$ - 阴片段在只存在缓冲液或 mAbs CSAT(抗- β_1) 或 P3G2（抗- $\alpha_v\beta_5$ ）的情况下，诱导广泛的新血管形成。相反，mAb LM609（抗- $\alpha_v\beta_3$ ）消除了浸润到肿瘤和周围 CAM 中的大多数血管。

- 25 为了定量分析 mAbs 对肿瘤诱导的血管生成的影响，用双盲方式通过两个观察镜，在立体显微镜下，计数 CAM 焦面内进入肿瘤的血管。在图 12 中每个数据柱表示血管的平均数 \pm 每组 12 个 CAMs（表示重复试验）的 SE。

- 30 以威克逊·兰萨姆测试的方法定量分析结果表明：与以缓冲液或其他 mAbs、p3G2 或 CSAT 处理的肿瘤相比，进入以 mAb LM609 处理肿瘤的血管数降低了三倍（ $P < 0.001$ ）。M21 - L 肿瘤不表达 $\alpha_v\beta_3$ 的事实表明：mAb LM609 是通过直接作用于血管而不是作用于肿瘤细

胞抑制血管生成。这一结果与图 3A - 3D 所示的 $\alpha_v\beta_3$ 在癌组织活检中组织分布相一致。其中， $\alpha_v\beta_3$ 的分布限于肿瘤血管中而不是肿瘤细胞本身。

2) 用合成肽处理

- 5 如上述方法，将实例 I 中制备的合成肽局部施用于肿瘤诱导的血管生成 CAM 实验。同样评论了肽对于血管生活能力的影响。

E 通过静脉内施用抑制肿瘤诱导血管生成

1) 用单克隆抗体处理

- 10 如实例 7D1 所述制备的肿瘤诱导血管用静脉注射 mAb 处理。如实例 7D1 所述将肿瘤置于 CAM 之上并用胶带密封窗口。如上所述对于鸡胚血管内静脉一次接种 200 μ g 纯化 mAb，然后将鸡胚孵化 7 天。如上所述观察血管生成的程度。如以下实施例 8 所述，在这时间阶段后，切除肿瘤并分析其重量以确定抗体暴露对于肿瘤生成的影响或抑制。

2) 用合成肽处理

- 15 再评价 CAM 试验系统中肽暴露于肿瘤诱导的维管结构的作用。用上述的中了 - CAM 制品，除代替 mAb 的静脉内注射，将按实施例 1 和实施例 7A2) 所述制备的合成肽分别静脉内至少可见的血管中。

- 20 在图 9A - 9C 中说明了用环肽，含 HCl 盐的 66203 和对照肽，62186 的 CAM 试验结果。在图 9A 中，用对照肽处理并不影响丰富的大量血管，所述血管是由肿瘤处理诱导生长到原来没有 CAM 血管的区域中的。在图 9B 中相反，将环 RGD 肽 66203（一种 $\alpha_v\beta_3$ ）拮抗剂用于滤纸，血管的形成受到抑制，剩下没有新脉管结构的区域。对位于放置肿瘤的相邻的血管没有任何有害的作用，这表明含 RGD 肽的抑制作用是特异性的并且是定位的。因此，在图 9C 中，将抑制肽静脉内注射到
- 25 CAM 试验系统中，在远离放置肿瘤的相邻区域内的 CAM 中存在的现存的血管没有影响。在所述区域内现存的血管不受流入那些血管中的抑制的影响，尽管从这些现存血管生长到肿瘤中的新血管受到抑制。因此，已经表明包括 66203 和 62184 的合成肽（前述在实施例 4 中配体 - 受体试验中所表明的，是 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂）抑制血管生成，但限于正在
- 30 发育的血管，而催芽成熟的现存血管没有影响。另外，在图 9C 中，有完整的维管结构表明，静脉内输注肽对周围区域没有任何不利的细胞毒性。

用实施例 1 中制备的和表 1 中所列的其他合成肽完成相似的试验。

8 按在 CAM 试验中测量的, 用 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂抑制肿瘤组织生长

按实施例 7D1) 中所述, 除肉眼观察评价抗- $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂对生长因子或肿瘤诱导的血管生成的作用外, 还通过测量暴露后, 肿瘤量的任何改变来评价所述拮抗剂的作用。为了进行所述分析, 按实施例 6C 和 7D 所述制备肿瘤诱导的血管生成 CAM 试验。在 7 天培养期末, 从 CAMs 中切出所得的肿瘤, 剥掉任何残留的 CAM 组织, 用 1 ml 磷酸缓冲盐洗涤, 然后确定每个肿瘤的湿重。

另外, 用于显微镜组织分析的肿瘤的制备方法包括将代表性的肿瘤固定在 Bulins Fixative 中 8 小时, 然后植入石蜡中。切出系列切片, 用苏木精和曙红 (H&E) 染色以用于分析。(葛莱逊, 临床观察, 88:1924(1991))。用 Olympus 化合物显微镜放大 250X, 将切片拍照。

A 局部施用

15 在表 4 中列出了因局部施用对照缓冲盐 (HBSS), P3G2 (抗- $\alpha_v\beta_5$) 或 LM609 (抗- $\alpha_v\beta_3$) 所得的典型人黑色素瘤肿瘤 (M21L) 重量的结果。在表的下部列出了就每种处理所评价了许多胚胎, 从每种处理计算的以 mg 计的平均肿瘤重量以及平均值的 SE。

表 4

<u>胚胎号</u> (mg)	<u>mAb 处理</u>	<u>肿瘤重量</u>
1	HBSS	108
2		152
3		216
4		270
5		109
6		174
1	P3G2	134
2		144
3		408
4		157

5		198
6		102
7		124
8		99
1	LM609	24
2		135
3		17
4		27
5		35
6		68
7		48
8		59

<u>mAb 处理</u>	<u>平均肿瘤重量(mg)</u>
HBSS 对照	172±26
P3G2	171±36
LM609	52±13

- 5 在 CAM 试验系统中, $\alpha_v\beta_3$ -阴性人黑色素瘤肿瘤量暴露于 LM609 会将 $172\text{ mg} \pm 26$ 未处理的平均肿瘤重量降低到 $52\text{ mg} \pm 13$ 。P3G2 抗体对肿瘤质量没有影响。因此, 局部施用 $\alpha_v\beta_3$ -特异性 LM609 抗体而阻断 $\alpha_v\beta_3$ 受体会使肿瘤质量退化并如前实施例所述, 抑制血管生成。因暴露于 P3G2 而产生的肿瘤的直径平均为约 8 毫米到 1 厘米。
- 10 相反, LM609 处理的肿瘤的平均直径为 2 - 3 毫米。

这些肿瘤的冷冻切片表明, 暴露于 P3G2 的肿瘤有完整的肿瘤细胞结构, 相反, 暴露于 LM609 的肿瘤没有有机化的细胞结构。因此 $\alpha_v\beta_3$ 受体活性对于 $\alpha_v\beta_3$ 阴性肿瘤是必需的, 通过 $\alpha_v\beta_3$ 表达的新脉管结构的发育而使其保持其营养量。用本发明的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂阻断 $\alpha_v\beta_3$ 会抑制血管生成到肿瘤中, 最终导致肿瘤质量的减小。

B 静脉内施用

在表 5 中列出了因静脉内施用对照缓冲液 (PBS, 磷酸缓冲的盐), CSAT(抗- β_1)或 LM609(抗- $\alpha_v\beta_3$)所得的典型癌肿瘤 (UCLAP-3) 的重量。在表从下部, 就每种处理评价了许多胚胎, 从中计算平

均肿瘤重量以及平均值的 SE。

表 5

	<u>胚胎号</u> (mg)	<u>mAb 处理</u>	<u>肿瘤重量</u>
	1	PBS	101
	2		80
	3		67
	4		90
	1	CSAT	151
	2		92
	3		168
	4		61
	5		70
	1	LM609	16
	2		54
	3		30
	4		20
	5		37
	6		39
	7		12
	<u>mAb 处理</u>		<u>平均肿瘤重量(mg)</u>
	PBS 对照		85±7
5	CSAT		108±22
	LM609		30±6

在 CAM 施用系统中, $\alpha_v \beta_3$ - 阴性人癌肿瘤量暴露于 LM609 会使未处理的平均肿瘤重量从 $85 \text{ mg} \pm 7$ 降低到 $30 \text{ mg} \pm 6$ 。CSAT 抗体对肿瘤量的重量没有显著的影响。因此, 静脉内施用 $\alpha_v \beta_3$ - 特异性的 LM609 抗体而阻断 $\alpha_v \beta_3$ 受体会使癌退化, 象在上述实施例中对于黑色素瘤肿瘤质量并抑制血管生成所表明的那样。另外, 静脉内注射 LM609 相似地抑制人黑色素瘤肿瘤的生长。

9 按在 CAM 试验中测量的,用 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂使肿瘤组织生长退化
为了评价 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂对肿瘤生长和存活的影响,将人黑色素瘤
片段和肺,胰腺和喉癌片段放在实施例 5A 中所述的 10 天龄胚胎的
CAMs 上。

5 A 静脉内施用

1) 用单克隆抗体处理

a 用 LM609 (抗- $\alpha_v\beta_3$) 和 CSAT (抗- β_1) 处理

将 $\alpha_v\beta_3$ -阴性人黑色素瘤 M-21L,胰腺癌 FG,人肺癌 UCLAP
-3 或人喉癌 HEP3 植入到 CAM 中 24 小时后,只用 PBS 或单剂量 (300
10 ug/100 ul) 的 mAb LM609 (抗- $\alpha_v\beta_3$) 或 CSAT (抗- β_1) 静
脉内注射胚胎。使肿瘤再增殖 6 天。在保温期末,小心地切出肿瘤,剥
去周围的 CAM 组织。由两个独立的研究者完成肿瘤切除,只剩下容易
鉴定的实体肿瘤。肿瘤有很好确定的边缘,因此可以除去容易区别于实
体肿瘤的薄半透膜 (CAM) 而不会影响肿瘤量本身。将切出的肿瘤称
15 重,然后进行形态学和组织学检验。

如图 13 所示,在 7 天末确定湿肿瘤重量,并与处理前开始的肿瘤
重量相比较。每个柱表示每组 5 - 10 个肿瘤的平均值 \pm S.E.. 在所有
检测的肿瘤中,与对照相比, mAb LM609 显著 ($p < 0.001$) 抑制肿瘤
生长。用 PBS 或 CSAT 处理的肿瘤在所有情况下均增殖了。相反, mAb
20 LM609 不仅抑制了这些肿瘤的生长,还在大多数情况下诱导了广泛的退
化。重要的是,这些肿瘤细胞并未表达整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表明,生长的抑
制作用是由于所述抗体对新血管结构而不是直接对肿瘤细胞的抗-血
管生成作用。

b 用 LM609 (抗- $\alpha_v\beta_3$) 和 P3G2 (抗- $\alpha_v\beta_5$) 处理

25 将人 M21 - L 黑色素瘤肿瘤片段 (50 mg) 植入到 10 天龄胚胎的
CAMs 中, 24 小时后,单独用 PBS 或单剂量 (300 ug/100 ul) 的 mAb
LM609 (抗- $\alpha_v\beta_3$) 或 P3G2 (抗- $\alpha_v\beta_5$) 静脉内注射胚胎。按
上述实施例 9A1) 中所述,使肿瘤增殖,然后按本文所述进行形态学和组织
学检验。

30 检验用 mAbs P3G2 (抗- $\alpha_v\beta_5$) 或 LM609 (抗- $\alpha_v\beta_3$) 处
理的代表性 M21 - L 肿瘤实例的形态学。P3G2 处理的肿瘤大 (直径 8
mm) 而且有很好的血管形成。而用 mAb LM609 处理的那些很小 (直

径 3 mm) 而且没有可检测的血管。

再通过制备组织学切片, 然后按实施例 9A1)a 中所述用苏木精和曙红染色来检测所述肿瘤。如图 14 所述(上组), 用 P3G2 (抗- $\alpha_v \beta_5$) 处理的肿瘤是大量可存活的, 并有如有丝分裂象(箭头头部)所表明的正在分裂的活性肿瘤细胞以及通过肿瘤基质的多血管(箭头)。相反, 在用 mAb LM609 (抗- $\alpha_v \beta_3$) 处理的肿瘤中很难检测到存活的肿瘤细胞或血管(图 14, 下组)。这些结果表明整合素 $\alpha_v \beta_3$ 拮抗剂抑制肿瘤诱导的血管生成, 从而导致体内各种人肿瘤的生长抑制和退化。要指出的是, 在肿瘤生长 7 天(胚胎 17 天)后检验的胚胎无论是否用 $\alpha_v \beta_3$ 拮抗剂处理, 在粗检时看起来均是正常的。这些发现表明这种整合素的拮抗剂对于正在发育的胚没有毒性。

2) 用合成肽处理

按实施例 5A 所述将人 M21 - L 黑色素瘤肿瘤片段 (50 mg) 植入 10 天龄胚胎的 CAMs 中。24 小时后, 胚胎静脉内接受 300 ug/ul 单剂量的环 RADfv(69601)和或环 RGDfv(66203)。总共 72 小时后, 取出肿瘤, 形态学检验, 然后按实施例 9A1)所述用立体显微镜拍照。

图 15A - 15E 中所示的组与如下相对应: 用环 RADfv(69601)处理的双份样品; 图 15B, 用环 RGDfv(66203)处理的双份样品; 图 15C, 从用环 RGDfv(66203)处理的相同胚胎取的相邻的 CAM 组合和图 15D 和 15E 放大的肽处理的肿瘤。图 15D 描述来自对照肽(69601)处理的肿瘤的正常血管。图 15E 描述了来自环 RGDfv(66203)处理的肿瘤的破碎血管(实例箭头)。

所述结果表明只有肽 66203 抑制血管形成, 还表明与肿瘤相邻的 CAM 组织中的血管不受影响。

25 10 通过体内兔眼模型试验测量用 $\alpha_v \beta_3$ 拮抗剂的肿瘤组织生长退化

在如眼角膜的天然透明结构中, 可以观察到抗- $\alpha_v \beta_3$ 拮抗剂对生长因子诱导的血管生成的影响。新血管从角膜的边缘(有丰富的血液供应)向角膜中心(正常是没有血液供应的)生长。血管生成刺激剂如 β FGF, 当用于角膜时诱导新血管从角膜边缘生长。用于角膜的血管生成拮抗剂抑制新血管从角膜边缘的生长。因此角膜通过内皮细胞从角膜的边缘侵入坚韧的胶原蛋白包裹的易见的角膜组织而进行血管生

成。因此兔眼模型试验提供了在将化合物直接植入到眼角膜中而直接观察血管生成刺激和抑制的体内模型。

A 体内兔眼模型试验

1) 用生长因子诱导的血管生成

5 在体内兔眼模型试验中用生长因子诱导血管生成并描述如下。

a 制备含生长因子和单克隆抗体的 hydron 颗粒

按 D'Amato 等人 (Proc.Natl.Acad.sci.,91:4082-4085(1994)) 所述制备含生长因子和 mAbs 的 hydron 聚合物颗粒。每个颗粒含 650 ng 与 sucralfate(Carafet,Marion Merrell Dow,Corporation)结合的生长因子
10 β FGF以稳定 β FGF并确保其缓慢释放到周围组织中。另外制备在 PBS 中含 40ug mAb LM609 (抗- $\alpha_v\beta_3$) 或 mAbP1F6 (抗- $\alpha_v\beta_5$) 的 hydro 颗粒。将所述颗粒灌注到特别制备的 Teflon 栓中,所述栓有一钻到其表面的 2.5 mm 核心。将约 12ul 的灌注材料放到每个栓中,在消毒套中过夜聚合。然后用紫外线消毒颗粒。

15 b 用单克隆抗体处理

每组试验有三只兔子组成,其中一只眼接受含 β FGF 和 LM609 的颗粒,另一只眼接受含 β FGF 和小鼠 mAb P1F6 (抗- $\alpha_v\beta_5$) 的颗粒。使用成对的眼试验比较 LM609 (抗- $\alpha_v\beta_3$) 和其他 mAb 和 PBS 对照提供了精确试验以说明所检测 mAbs 之间显著不同的方法。

20 P1F6 mAb 与在血管内皮细胞表面上发现的但与推测血管生成无关的整合素 $\alpha_v\beta_5$ 发生免疫反应。为了确定 mAb P1F6 释放与血管生成有关,制备只含这种 mAb 的颗粒并按下文所述检测以确定所述 mAb 不诱导血管生成。

根据熟知的方法,用 Protein-A Sepharose CL-4B 亲和柱层析从腹
25 水液体中纯化所有检测的 mAbs。然后对 PBS 透析洗脱的免疫球蛋白,用 Detoxi - 凝胶(皮尔斯化学公司)处理以除去内毒素。已经表明内毒素是潜在血管生成和炎症刺激剂。因此,用 Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate Assay(Bio-whittaker)检测 mAbs 存在内毒素的情况,兔眼模型试验只使用那些 mAbs 而没有可检测的内毒素。

30 将含 β FGF 和 mAb LM609 (抗- $\alpha_v\beta_3$) 或 P1F6 (抗- $\alpha_v\beta_5$) 的 hydron 颗粒插入到在兔眼中形成的角膜袋中。所述 hydron 颗粒还含有 sucralfate 以便在使用过程中稳定 β FGF。将单颗粒植入到手

术产生的在兔角膜中基质内形成的“袋”中。手术过程在无菌条件下完成，使用备有分光器的 Wild M691 型操作显微镜，它嵌有一拍照记录个体角膜的镜头。通过用 69 Beaver 刀片在半角膜厚度作一 3 mm 切口，而在角膜基质中产生 3 mm × 5 mm 的“袋”。用一虹膜刮刀沿周围切

5 基质，从边缘 2 mm 的外周边缘植入所述颗粒。

在此后的 14 天， β FGF 和 mAb 从植入的颗粒中扩散到周围组织中，由此影响角膜边缘的血管生成。

在图 16A - 16E 中描述了每种处理情况的代表性结果。确定操作的血管量，并以如下定义的钟点描述。象钟表分成钟点一样，将眼分成 12

10 个相等的区。“血管的一个钟点”指血管填充等于钟表上一个钟点的眼面积的量。只接受 β FGF 的 5 只兔子有鲜红的血管生成，其中新血管已经从角膜的边缘生长到正常来讲没有血管的角膜中心。其中一只对于所述颗粒只有 1 个钟点的血管。两只接受 β FGF 和 mAb LM609 的兔子直到手术后 14 天绝对没有可检测的血管生成。其中 1 只兔子在 14 天末

15 有 3 个出血病灶和出芽血管。2 只接受 β FGF 和 mAb P3G2 (抗 - $\alpha_v \beta_5$) 的兔子有广泛的血管形成，其中新血管已经从角膜的边缘生长到角膜中。其中 1 对于所述颗粒只有 1 - 2 小时的血管。

如在兔眼模型试验中所说明的，在接受 mAb LM609 (抗 - $\alpha_v \beta_3$) 的兔子中，存在生长因子 β FGF 的情况下，对正常 paralimbal 血管没有血管生成作用。相反，在接受 mAb P3G2 (抗 - $\alpha_v \beta_5$) 的兔子中，存在生长因子 β FGF 的情况下，对正常 paralimbal 血管有血管生成作用。由 mAb LM609 产生了完全的角膜血管生成抑制实质上大于任何以前报告的抗 - 血管生成试剂。

20

11 用嵌合小鼠：人试验测量 $\alpha_v \beta_3$ 拮抗剂产生的体内肿瘤组织生长的退化

25

通过用人新生儿包皮代替 SCID 小鼠的部分皮肤而产生体内嵌合的小鼠：人模型 (图 17)。皮肤移植后，用癌细胞接种人包皮。得到可测量的肿瘤后，将 mAb LM609 (抗 - $\alpha_v \beta_3$) 或 PB 注射到小鼠尾静脉中，2 - 3 星期后，切出肿瘤，进行重量和组织学分析。

30 A 体内嵌合小鼠：人试验

基本上按 Yan 等人 (J.Clin.Invest.,91:986-996(1993)) 所述制备体内嵌合小鼠：人模型。总而言之，从 SCID 小鼠 (6 - 8 周龄) 身上手

术取 2 cm² 的皮肤，用人包皮代替。将所述小鼠麻醉，在侧腹部的每一侧用剪刀从 5 cm² 的面积上去掉毛发。除去皮肤到筋膜的全部厚度，制备两个 2 cm² 的移植床。将来自新生儿包皮的相同大小的全厚度皮肤放到伤口上并缝合好。用与皮肤缝合的 Band-Aid 覆盖移植部位。再用微孔布带盖在伤口上。

使用 M21L 人黑色素瘤细胞系或 MDA 23.1 乳腺癌细胞系 (ATCC HTD 26; 与 mAb LM609 的组织切片免疫反应为 $\alpha_v\beta_3$ 阴性) 以便在 SCID 小鼠的人皮肤移植物上形成实体人肿瘤。将 5×10^6 M21 - L 或 MDA 23.1 细胞的单细胞悬浮液皮内注射到人皮肤移植物中。然后观察小鼠 2 - 4 星期以使可测量的人肿瘤生长。

B 静脉内施用

1) 用单克隆抗体处理

在可测量的肿瘤生长后，对已经用 M21L 肿瘤细胞注射过的 SCID 小鼠每周静脉内注射两次 250 ug mAb LM609 (抗 - $\alpha_v\beta_3$) 或 PBS 至尾静脉 2 - 3 星期。然后，从皮肤上切出肿瘤，剥去周围组织。每种处理评价数只小鼠从每种处理计算的平均肿瘤重量并列在表 6 的底部。

表 6

<u>胚胎号</u>	<u>mAb 处理</u>	<u>肿瘤重量</u>
<u>(mg)</u>		
1	PBS	158
2		192
3		216
4		227
5	LM609	195
6		42
7		82
8		48
9		37
10		100
<u>mAb 处理</u>		<u>平均肿瘤重量(mg)</u>

PBS 198

LM609 113

5 在小鼠：人嵌合试验系统中，M21L $\alpha_v\beta_3$ - 负人癌肿瘤量暴露于 LM609（抗- $\alpha_v\beta_3$ ）会使 PBS 处理的平均肿瘤重量从 198 mg 降到 113 mg。

对 mAb LM609（抗- $\alpha_v\beta_3$ ）和 PBS 处理的 M21L 肿瘤的代表性实例进行形态学检验。PBS 处理的肿瘤大（直径为 8 - 10 mm）并且有很好的血管形成，而用 mAb LM609（抗- $\alpha_v\beta_3$ ）处理的那些很小（直径 3 - 4 mm）并且没有可检测的血管。

10 在用 MDA 23.1 细胞注射的皮肤移植物中形成的肿瘤是可检测和可测量的。确定肿瘤的形态学检验表明，已经发生了从移植的人组织到 MDA 23.1 肿瘤细胞的新血管形成。

15 因此，在该模型系统中，静脉内施用 $\alpha_v\beta_3$ - 特异性 LM609 抗体来阻断 $\alpha_v\beta_3$ 受体会导致以与实施例 9 和 10 中分布描述的 CAM 和兔眼模型系统相同的方式使癌退化。

12 用 CAM 试验测量，存在整合素 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂的情况下，刺激血管细胞进入细胞循环并进行细胞凋亡

20 血管生成过程显然依赖于细胞因子如 β FGF 和 VEGF 刺激血管细胞增殖的能力。米格耐特等，细胞 .Biochem.,471:201(1991);Takeshita et al., 临床观察杂志，93:662(1994);and Koyama et al.,J. 细胞.Physiol.158:1(1994)。但是，也很显然，信号过程可以调节中心血管细胞分化成成熟的血管。因此，可以设想，干扰与正在进行新生长或血管生成的血管细胞的生长或分化就可以影响血管生成。

25 已经表明在体外整合素连接的过程参与了细胞增殖和细胞凋亡或程序化细胞死亡。施沃兹,癌症研究,51:1503(1993);麦瑞迪斯等,分子生物学细胞,4:953(1993);弗瑞施 et al.,细胞生物学杂志 124:619(1994);and 罗拉蒂等，细胞,77:477(1994)。 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂对血管生成的详细的检验表明存在不连续的和破碎的肿瘤血管。因此，血管连续性的丢失可能是由于血管细胞的选择性坏死或细胞凋亡。

30 为了研究这种可能性，在用生长因子 β FGF 诱导血管生成和用 mAb 和本发明环肽处理后检验 CAMs。

A 用单克隆抗体处理

可以用各种方法检测细胞凋亡,包括直接检验从组织中分离的 DNA 以检测所述 DNA 的片段化,用特异性检测成片段 DNA 的游离 3'OH 基的抗体检测完整组织中的 3'OH。

1) DNA 片段化的分析

5 按实施例 6A 所述,将用 β FGF 饱和的滤纸片放在 10 天龄胚胎的 CAMs 上而诱导血管生成。用 LM609 (抗- $\alpha_v\beta_3$) 的免疫组织学分析表明在用 β FGF 开始血管生成后 12 - 24 小时,在血管中有 $\alpha_v\beta_3$ 的峰表达。因此,用 β FGF 刺激 24 小时后,只用 PBS 或含 300 μ g mAb CSAT (抗- β_1) 或 LM609 (抗- $\alpha_v\beta_3$) 的 PBS 静脉内接种胚胎。

10 静脉内接种 LM609 (抗- $\alpha_v\beta_3$), CSAT (抗- β_1) 或 PBS 后 24 获 8 小时,切除在 β FGF 饱和的滤纸片下的 CAM 组织而检测 DNA 的成片段化。用消毒 PBS 将切除的 CAM 组织洗涤 3 次,仔细剪碎,重悬在 0.25% 细菌胶原蛋白酶 (Worthington Biochemical; Freehold, NL) 中,在 37 $^{\circ}$ C 保温 90 分钟,偶尔搅拌。按前述,从单细胞悬浮液中的等量 CAM 细胞中提取 DNA。比索尼等 et al., 自然,359:552(1992)。总之,在 10 mM tris-Cl, pH8.0, 10 mM EDTA 在 0.5% Triton X-100 中 (Sigma, St. Louis, MO) 的 10 mM EDTA 中溶解等量的 CAM 细胞。在 4 $^{\circ}$ C 将以 16000xg 将细胞溶胞产物离心 15 分钟以从完整的染色质颗粒中分离可溶的片段 DNA。洗涤片段 DNA, 沉淀, 20 然后在 1.2% (w/v) 琼脂糖凝胶上分离。

从每种处理的等量 CAM 细胞中分离可溶的片段 DNA, 在琼脂糖凝胶上电泳分离, 然后通过溴化乙锭染色来观察。在处理 24 小时后, 来自三种不同处理的 DNA 片段的相对量没有差异。但是, 到用 mAb LM609 (抗- $\alpha_v\beta_3$) 处理后 48 小时为止, 与用 mAb CSAT (抗- β_1) 或 PBS 单独处理的胚胎相比, 观察到 DNA 片段的显著增加。 25

2) 刺激血管细胞进入细胞周期

为了试验检测 $\alpha_v\beta_3$ 在这些过程中的作用, 用 propidium iodide 将来自用或不用 β FGF 处理的 CAMs 的细胞染色, 然后与 mAb LM609 (抗- $\alpha_v\beta_3$) 免疫反应。

30 将用 mAb LM609 (抗- $\alpha_v\beta_3$), mAb CSAT (抗- β_1) 或 PBS 处理 24 或 48 小时后, 从胚胎中分离的 CAMs 通过与上述细菌胶原蛋白酶保温而溶解成单细胞悬浮液。然后透性性单细胞, 用 Apop Tag

Insitu Detection 试剂盒, 按制造商 (Oncor ,Gaithersburg,MD) 染色。Apop Tag 是特异性检测片段 DNA 游离 3'OH 基的抗体。检测所述游离 3'OH 基的方法是成熟的检测细胞凋亡细胞的方法。葛瑞理 et al.,J.细胞 Biol.119:493(1992)。

5 然后用 PBS 中 0.1%(v/v) Triton X-100 漂洗 Apop Tag 染色的细胞, 并将其重悬在含 0.5%(w/v)BSA,0.02%(w/v)叠氮化钠和在 PBS 中的 200 ug/mlRnase A 的 FACS 缓冲液中。将细胞保温 1.5 小时, 洗涤然后用荧光激活细胞分类术分析。用 FACScan 流式细胞计数器测量细胞荧光, 并按如下所述分析。

10 用 FACScan 流式细胞计数器 (Becton Dickinson ,Mountain View ,CA)测量细胞荧光。同时确定侧扫描 (SSC)和前扫描 (FSC), 用备有 FACScan 研究软件 (Becton Dickinson ,Mountain View ,CA) 的 Hewlet Packard(HP9000)收集所有数据。用 P.C Lysis version I 软件 (Becton Dickinson ,Mountain View ,CA) 分析所述数据。使用未加入 Apop Tag 试剂盒中的一级抗体的细胞悬浮液设定负对照栅。将相同的栅用于所有两种细胞前体, 每种不同的处理分析约 8000 个细胞。

20 在图 18 中列出了来自 mAb 处理的 CAMs 并用 Apop Tag 染色的单细胞的百分比。黑柱表示来自分析前 24 小时处理的胚胎的细胞。条柱表示来自分析前 48 小时处理的胚胎的细胞。每个柱均表示三个样品的平均值 \pm S.E..

如图 18 所示, 与只用 PBS 或 CSAT (抗 - β_1) 处理的 CAMs 相比, 用 mAb LM609 (抗 - $\alpha_v\beta_3$) 处理的 CAMs 在 Apop Tag 染色方面有 3 - 4 倍的增加。

B 用合成肽处理

25 再用本发明的合成肽完成实施例 6A 中所述的生长因子诱导的血管生成的 CAM 试验以确定环肽对细胞凋亡的影响。按实施例 1 中所述制备肽环 - RGDfV(66203)和环 - RADfV(69601)。以 300 ug/ml 的浓度将肽溶液或 PBS 注射到 CAM 制品中。在 24 或 48 小时, 切出滤纸和周围的 CAM 组织, 用 Apop Tag 染色以按实施例 12A2)中所述检测细胞凋
30 亡。

如图 18 所示, 与只用 PBS 或对照环肽 69601 (环 - RADfV) 处理的 CAMs 相比, 用肽 66203(环 - RGDfV)处理前两天的 CAMs 在 Apop

Tag 染色方面有 3 - 4 倍的增加。

C 单克隆抗体处理对细胞凋亡和细胞周期的影响

通过 propidium iodide 染色检测单细胞悬浮液的染色体 DNA 拷贝数以确定用单克隆抗体处理对细胞周期的影响，用 Apop Tag 染色检验细胞凋亡。

按实施例 12A1)所述制备用 mAb LM609 (抗- $\alpha_v\beta_3$) 或 CSAT (抗- β_1) 或 PBS 预处理 24 或 48 小时 CAM 的单细胞悬浮液。

为了用 Apop Tag 将细胞染色，用含 2.5%(w/v)BSA 和 0.25%(w/v)叠氮化钠的 PB 将细胞悬浮液洗涤三次。然后将细胞在 1% 仲甲醛的 PBS 中固定 15 分钟，然后按上述洗涤三次。为了防止非特异性结合，用 5% (w/v)BSA 的 PBS，在 4℃ 过夜阻断单细胞悬浮液。然后按前述洗涤细胞，用 Apop Tag 染色，用上述实施例 12A 中所述的 FACScan 测量细胞荧光。

用在 PBS 中 10 ug/ml 的 propidium 碘化物 (Sigma, St.Louis, MO) 将来自各试验条件的细胞染色 1 小时，用 PBS 洗涤两次，分析细胞凋亡的核酸特征类型，包括染色质浓缩和片段化。通过细胞的形态学分析评估细胞凋亡细胞的百分比，所述细胞来自至少 10 - 15 个随机选择的显微镜视野。

在图 19 中给出了来自用 CSAT (抗- β_1) 或 LM609 (抗- $\alpha_v\beta_3$) 处理的，用 Apop Tag 的，用 FACS 分析的胚胎 CAMs 的单细胞悬浮液的结果。Y 轴表示 Apop Tag (细胞凋亡)，X 轴表示 propidium 碘化物染色 (DNA 含量)。水平线表示 Apop Tag 染色的负栅。左右图分别表示 CSAT 和 LM609 处理的胚胎。用每种条件的约 8000 个过程的分析完成细胞循环分析，用等值图表示数据。

用 DNA 染料 propidium 碘化物染色的单细胞样品表明，在处理 48 小时后，25 - 30% LM609 (抗- $\alpha_v\beta_3$) 处理的 CAM 细胞有核酸浓缩和/或成片段的迹象。这些过程是正在进行细胞凋亡的细胞的特征这与 CSAT (抗- β_1) 处理的 CAMs 相反，其中 90 - 95% 的细胞有正常的核酸染色。

如在图 19 中所表明的，与 LM609 诱导的细胞凋亡一致，含不到一拷贝 DNA 的细胞显著数量有一峰 (AO)。所述峰以前在晚期细胞凋亡细胞中代表片段 DNA。泰尔福德等细胞测量学,13:137(1992)。此外，

用 Apop Tag 很容易将这些 AO 细胞染色，这确定了所述试剂检测细胞凋亡细胞的能力。然而，除在 AO 中的细胞染色外，用也能将大量含一拷贝以上 DNA 的细胞染色（图 19）。这些结果表明 LM609 有能力促进已经进入细胞循环的血管细胞的细胞凋亡。相反，来自进入细胞循环的对照 CAMs 的细胞只有极小的 Apop Tag 染色，这与在对照处理的 CAMs 中检测到很少的细胞凋亡细胞相一致。

在 β FGF 刺激的 CAMs 中已进入细胞周期（S 和 G2/M 相）的细胞中，用 LM609（抗- $\alpha_v\beta_3$ ）染色 70% 是阳性。这与来自非 β FGF 处理的 CAMs 的周期中的细胞中，有 10% LM609 染色形成对比。这些发现表明 β FGF 刺激后，大部分带 $\alpha_v\beta_3$ 的细胞有活性增殖。

与这些发现一起考虑，表明静脉内注射 mAb LM609 或 $\alpha_v\beta_3$ 的环肽拮抗剂促进血管生成诱导后鸡 CAM 内的细胞凋亡。

再组织学检测 CAMs，通过与 LM609 免疫反应检测 $\alpha_v\beta_3$ 的表达，通过与 Apop Tag 免疫反应性检测正在经细胞凋亡的细胞。洗涤实施例 5A 中从用 LM609（抗- $\alpha_v\beta_3$ ），CSAT（抗- β_1 ）或 PBS 预处理 48 小时处理的胚胎切除而制备的 CAM 切片，植入 OTC（Baxter），然后在液氮中迅速冷却。切出 6 微米厚的 CAM 组织，用丙酮固定 30 秒，于 -70°C 贮存直到施用。通过用 70%（v/v）乙醇（ETOH）漂洗为染色而制备的组织切片，然后用 PBS 洗涤三次。接着，用在 PBS 中的 5%（w/v）BSA 将切片阻断 2 小时，然后与 10 $\mu\text{g/ml}$ mAbLM609 保温 2 小时。然后洗涤所述切片，与 1: 50 稀释的若丹明结合的山羊抗-小鼠 IgG(Fisher Scientific Prttsburg, PA)一起保温 2 小时。最后，洗涤相同的切片，然后按实施例 12A2) 中所述，用 Apop Tag 染色。固定染色的切片，然后用共焦免疫荧光显微镜分析。

在图 20 中，A - C 组表示来自 CSAT（抗- β_1 ）处理的胚胎的 CAM 组织，D - F 表示来自 LM609 处理的胚胎的 CAM 组织。A 和 D 描述了用 Apop Tag 染色的，用在 D.I.C. 成像上重叠的荧光（FITC）观察的组织。B 和 E 表示用 mAb LM609（抗- $\alpha_v\beta_3$ ）染色并用荧光（若丹明）观察的相同组织。C 和 F 表示用 Apop Tag 和 LM609 染色所相同组织的图像，其中黄色表示共同的位置。左右柱分别表示 15 和 50 μM 。

如图 20（A - C）所示，静脉注射 CSAT 或 PBS 对照之后，以

5 Apop Tag 染色的血管量少且随机，表明组织内细胞凋亡的低水平。相反，以 LM609 或环肽 203 预处理的胚的 CAM 显示了多数血管被 Apop Tag 强烈染色，而周围非血管细胞中反应性较低（图 20D - F）。而且，当 Apop Tag 和 LM609 共同用于染色组织（19C 和 19F）时，仅在衍生于用 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂处理的胚的 CAM 的标志上观察到明显的共定位（图 20F）。这些发现证实，活体中，诱导血管生成之后，整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的抑制剂选择性起始载有 $\alpha_v\beta_3$ 血管的凋亡。

10 尽管血管生成是涉及许多分子和细胞生物学观察的复杂过程，而一些线索表明血管细胞整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在该过程中起了相对晚的作用。首先，免疫组织学分析表明在用 β FGF 诱导血管生成后 12 - 24 小时，在血管细胞上的 $\alpha_v\beta_3$ 表达达到最大。第二， $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂干扰由多激活剂诱导血管生成表明，该受体与导致血管生成的可能所有一级信号途径的下游共同途径有关。第三，直到用这些拮抗剂处理 48 小时，mAb LM609 或环肽处理的 CAMs 才在细胞凋亡方面有显著的增加。最后，
15 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂促进已被诱导进入细胞循环的血管细胞的细胞凋亡。

本文的结果提供了整合素连接的可以调节体内细胞存活的第一个直接证据。因此，假设，一旦血管生成开始，个体血管细胞就开始分裂，并开始向血管生成源运动，此后， $\alpha_v\beta_3$ 连接提供了一种信号，可以使连续的细胞存活，从而导致成熟血管的分化和形成。但是，如果 $\alpha_v\beta_3$ 连接受到抑制，细胞不能接到这种分子信号，细胞会因错误而进入
20 细胞凋亡。所述假设还预测在分化发生后，成熟血管不再需要与存活有关的 $\alpha_v\beta_3$ 信号，因此，对于这种整合素的拮抗剂是难以控制的。

最后，本文的结果提供了整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的拮抗剂可以提供治疗以血管生成为特征的瘤形成或其他疾病的有力的治疗方法。首先， $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂破坏了新形成的血管而不会影响现存的维管结构。第二，这些拮抗剂对鸡胚胎的生命力没有显著的影响，表明它们是非毒性的。第三，
25 不论血管生成刺激与否，血管生成均受到显著的抑制。最后，全身施用 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂会使各种组织学不同的人肿瘤明显退化。

因此，前述的实施例说明整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在各种刺激诱导的血管生成中起关键作用，而所述 $\alpha_v\beta_3$ 是用本发明 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂治疗以新血管形成为特征的疾病的有价值的治疗靶。
30

认为上面的说明书促以使本领域专业人员实施本发明。本发明并不

限于所保藏的细胞系，原因在于保藏的实施方案是为了单说本发明的一个方面，功能等同的任何细胞系均在本发明的范围内。材料的保藏不构成一种许可：本文所含的描述不能足以实施本发明的任何方面，包括其最佳方式，它也不构成对它所代表的具体说明的权利要求的限制。确实，除本文所示和所描述的外，从前文的描述各种改变对于本领域专业人员来说是显而易见的，而且在本发明权利要求的范围内。

序列表

(1) 一般资料

(i) 申请人

- 5 (A) 名称: **The Scripps RESEARCH INSTITUTE**
(B) 街道: **10666 NORTH TORREY PINES ROAD**
(C) 城市: **LA JOLLA**
(D) 州: **CA**
(E) 国家: **USA**
(F) 邮编 (ZIP): **92037**
10 (G) 电话: **619 - 554 - 2937**
(H) 电传: **619 - 554 - 6312**

(ii) 序列数: 14

(iv) 计算机可读形式:

- 15 (A) 介质类型: **软盘**
(B) 计算机: **IBM PC 兼容的**
(C) 操作系统: **PC - DOS/MS-DOS**
(D) 软件: **PantentIn Release # 1.0 ,Version # 1.25(EPO)**

(v) 目前的申请资料

- 20 (A) 申请号: **PCT/US/95/**
(B) 申请日: **09 - MAR - 1995**

(vi) 在前申请资料

- (A) 申请号: **US 08/210,715**
(B) 申请日: **18 - MAR - 1994**

(vii) 在前申请资料

- 25 (A) 申请号: **US 08/366,665**
(B) 申请日: **30 - DEC - 1994**

(2) SEQ ID NO: 1 的资料

(i) 序列特征:

- 30 (A) 长度: **6 个氨基酸**
(B) 类型: **氨基酸**
(C) 链型: **单链**
(D) 拓扑结构: **线性**

- (ii)分子类型: 肽
- (iii)假设: 无
- (iv)反义: 无
- (v)片段类型: 内部的

5 (ix)特征:

- (A) 名称/关键词: 肽
- (B) 位置: 1..6
- (C) 其他信息: /标记 = BOC - GRGDFV - OMe
/注释=BOC表示N-末端保护基丁氧基羰基;
OMe指C-末端甲基酯; 在第2位的Arg

10

(ix)特征:

- (A) 名称/关键词: 肽
- (B) 位置: 1..6
- (C) 其他信息: /标记 = OMe

15

/注释=OMe指C-末端保护基甲基酯

(ix)特征:

- (A) 名称/关键词: 肽
- (B) 位置: 1..6
- (C) 其他信息: /标记 = Arg

20

/注释=D - Arg中的前缀“D”指在位置2上的
Arg是D-氨基酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 1:

Gly Arg Gly Asp Phe Val

25

1 5

(2)SEQ ID NO: 2: 的资料

(i)序列特征:

- (A) 长度: 6个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

30

(ii)分子类型: 肽

- (iii)假设: 无
- (iv)反义: 无
- (v)片段类型: 内部的

(ix)特征:

- 5 (A) 名称/关键词: 肽
- (B) 位置: 1..6
- (C) 其他信息: /标记 = BOC
/注释=BOC 表示 N - 末端阻断基叔丁氧基羰基;

(ix)特征:

- 10 (A) 名称/关键词: 肽
- (B) 位置: 1..6
- (C) 其他信息: /标记 = OH
/注释=OH 指游离 C - 末端羧酸

(ix)特征:

- 15 (A) 名称/关键词: 肽
- (B) 位置: 1..6
- (C) 其他信息: /标记 = Arg
/注释=D - Arg 中的前缀 “D” 指在位置 2 上的
Arg 是 D - 氨基酸

20 (xi)序列描述: SEQ ID NO: 2:

Gly Arg Gly Asp Phe Val

1 5

(2) SEQ ID NO: 3 的资料

(i)序列特征:

- 25 (A) 长度: 6 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽

- 30 (iii)假设: 无
- (iv)反义: 无
- (v)片段类型: 内部的

(ix)特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1..6

(C) 其他信息: /标记 = H

5

/注释=H 是游离 N - 末端胺

(ix)特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1..6

(C) 其他信息: /标记 = OH

10

/注释=OH 指 C - 末端羧酸

(ix)特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1..6

15

(C) 其他信息: /标记 = Arg

/注释=D - Arg 中的前缀 “ D ” 指在位置 2 上的

Arg 是 D - 氨基酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 3:

Gly Arg Gly Asp Phe Val

20

1

5

(2) SEQ ID NO: 4 的资料

(i)序列特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

25

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

30

(v)片段类型: 内部的

(ix)特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1..6

(C) 其他信息: /标记 = 环

/注释=环指环肽; 小字母表示 D - 氨基酸; 大写字母表示 L - 氨基酸

5 (xi)序列描述: SEQ ID NO: 4:

Gly Arg Gly Asp Phe Val

1 5

(2) SEQ ID NO: 5 的资料

(i)序列特征:

10 (A) 长度: 5 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 环状

(ii)分子类型: 肽

15 (iii)假设: 无

(iv)反义: 无

(v)片段类型: 内部的

(ix)特征:

(A) 名称/关键词: 肽

20 (B) 位置: 1..6

(C) 其他信息: /标记 = 环

/注释=环指环肽; 小写字母表示 D - 氨基酸; 大写字母表示 L - 氨基酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 5

25 Arg Gly Asp Phe Val

1 5

(2) SEQ ID NO: 6 的资料:

(i)序列特征:

30 (A) 长度: 5 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 环状

- (ii)分子类型: 肽
- (iii)假设: 无
- (iv)反义: 无
- (v)片段类型: 内部的

5 (ix)特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1..5

(C) 其他信息: /标记 = 环

/注释=环指环肽; 小写字母表示 D - 氨基酸; 大

写表示 L - 氨基酸

10

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 6:

Arg Ala Asp Phe Val

1 5

(2) SEQ ID NO: 7 的资料

15

(i)序列特征:

(A) 长度: 5 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 环状

20

(ii)分子类型: 肽

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

(v)片段类型: 内部的

(ix)特征:

25

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1..6

(C) 其他信息: /标记 = 环

/注释=环指环肽; 小写字母表示 D - 氨基酸; 大

写表示 L - 氨基酸

30

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 7

Arg Gly Asp Phe Val

1 5

(2) SEQ ID NO: 8 的资料

(i)序列特征:

(A) 长度: 5 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

5 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

10 (v)片段类型: 内部的

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 8

Tyr Thr Ala Glu Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg Gly Asp Val Phe

1 5 10 15

(2) SEQ ID NO: 9 的资料

15 (i)序列特征:

(A) 长度: 5 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 环状

20 (ii)分子类型: 肽

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

(v)片段类型: 内部的

(ix)特征:

25 (A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1..5

(C) 其他信息: /标记 = 环

/注释=环指环肽; 小写字母表示 D - 氨基酸; 大
写表示 L - 氨基酸

30 (xi)序列描述: SEQ ID NO: 9

Arg Ala Asp Phe Val

1 5

(2) SEQ ID NO : 10 的资料

(i)序列特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

5 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 环状

(ii)分子类型: 肽

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

10 (v)片段类型: 内部的

(ix)特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1..6

(C) 其他信息: /标记 = 环

15 /注释=环指环肽; 小写字母表示 D - 氨基酸; 大
写表示 L - 氨基酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO : 10

Ala Arg Gly Asp Phe Val

1 5

20 (2) SEQ ID NO : 11 的资料

(i)序列特征:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

25 (D) 拓扑结构: 环状

(ii)分子类型: 肽

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

(v)片段类型: 内部的

30 (ix)特征:

(A) 名称/关键词: 肽

(B) 位置: 1..6

(C) 其他信息: /标记 = 环

/注释=环指环肽; 小写字母表示 D - 氨基酸; 大
写表示 L - 氨基酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 11

5 Gly Arg Gly Asp Phe Val

1 5

(2) SEQ ID NO: 12 的资料

(i) 序列特征:

(A) 长度: 12 个氨基酸

10 (B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

15 (iv) 反义: 无

(v) 片段类型: 内部的

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 12

Tyr Arg Cln Val Val Cys Asp Leu Gly Asn Pro Met

1 5 10

20 (2) SEQ ID NO: 13 的资料

(i) 序列特征:

(A) 长度: 13 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

25 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假设: 无

(iv) 反义: 无

(v) 片段类型: 内部的

30 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 13

Gly Val Val Arg Asn Asn Glu Ala Leu Ala Arg Leu Ser

1 5 10

(2) SEQ ID NO: 14 的资料

(i)序列特征:

(A) 长度: 11 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

5

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

10

(v)片段类型: 内部的

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 14

Thr Asp Val Asn Gly Asp Gly Arg His Asp Leu

1

5

10

说明书附图

抗- β 3



正常皮肤

图 1 A



肉芽组织

图 1 B

抗- β 3

抗- β 1



正常皮肤

图 1 C



肉芽组织

图 1 D

抗- β 1

正常皮肤

抗-vWF



图 2 A

肉芽组织

抗-vWF

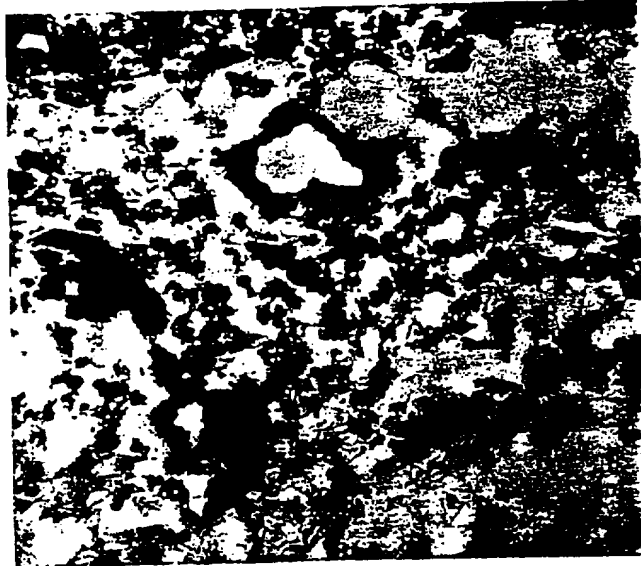


图 2 B

正常皮肤

抗-层粘连蛋白



图 2 C

肉芽组织

抗-层粘连蛋白

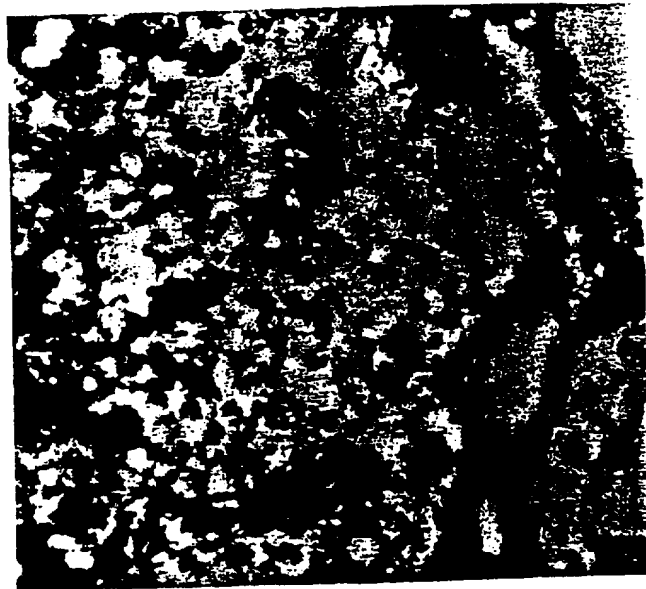
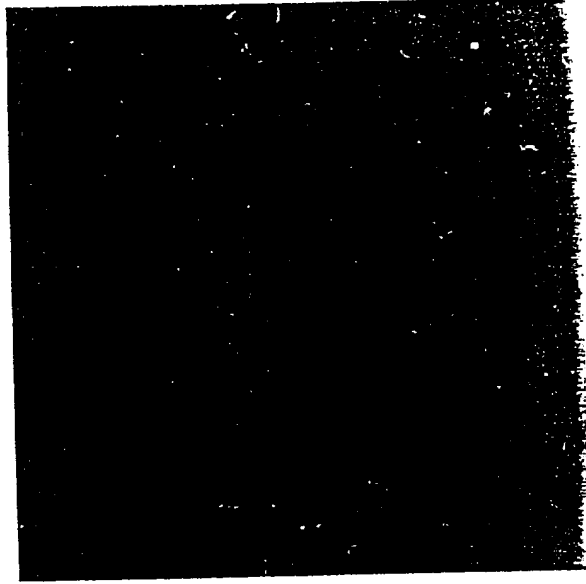
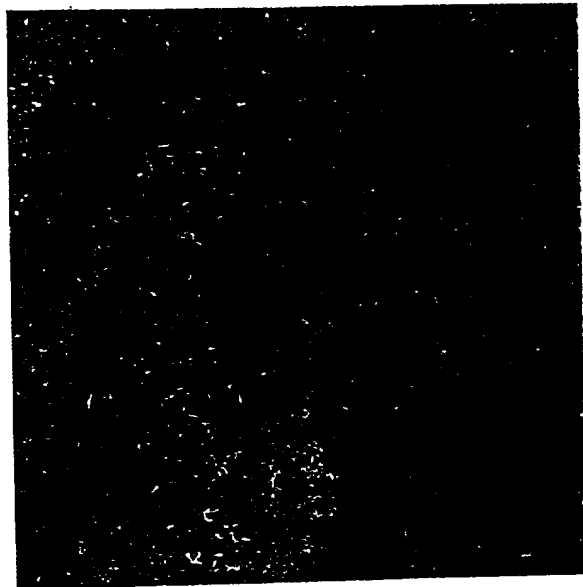


图 2 D



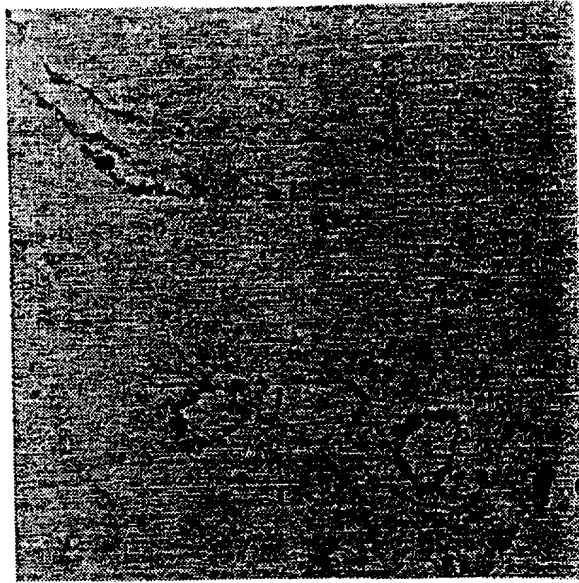
膀胱癌

图 3 A



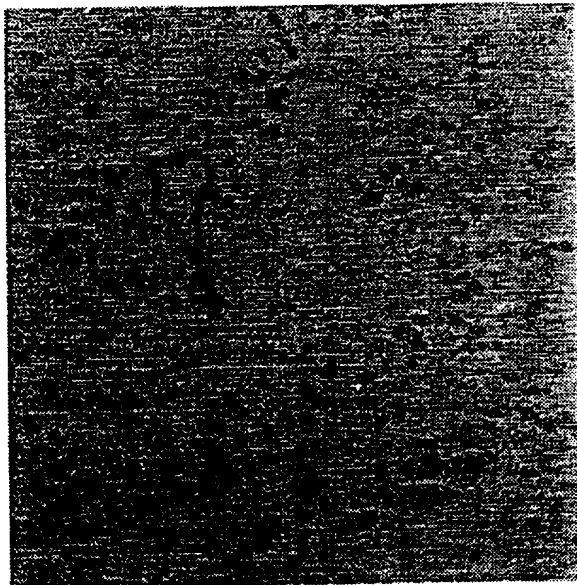
结肠癌

图 3 B



乳腺癌

图 3 C



肺癌

图 3 D

对照



图 4

图 5 A

未处理的抗
- β_1

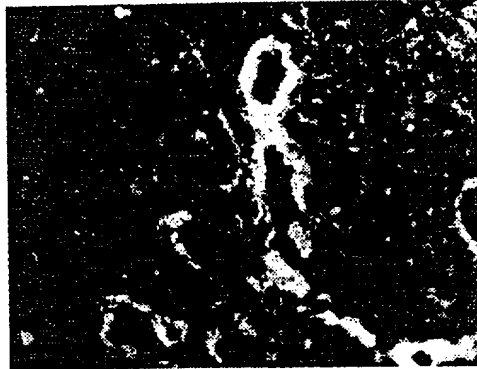


图 5 B

未处理的抗
- $\alpha v \beta_3$

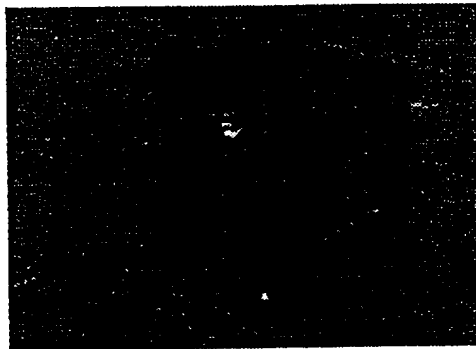
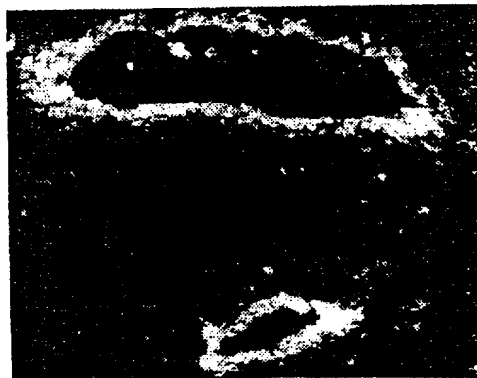


图 5 C

bFGF 处理的
抗 - $\alpha v \beta_3$



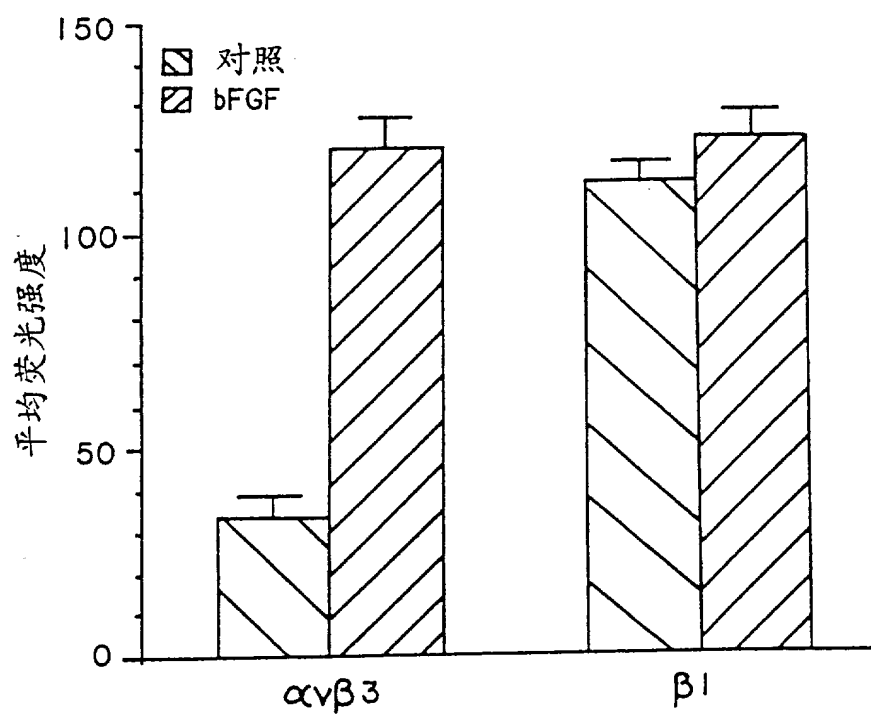


图 6

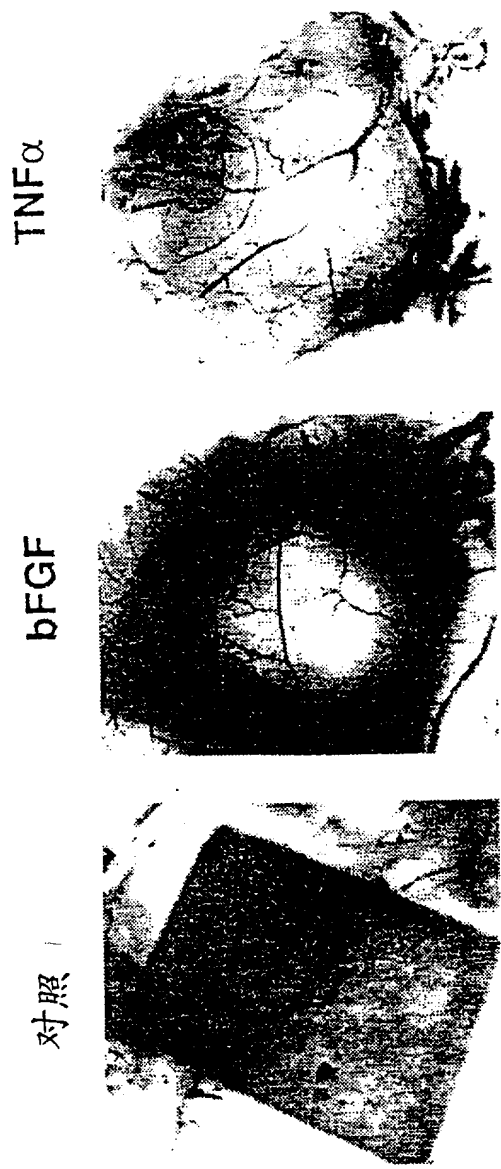


图 7 A 图 7 B 图 7 C

图 8 A

对照



bFGF



图 8 B



图 8 C

抗-β₁



图 8 D

抗-α_vβ₅



图 8 E

抗-α_vβ₃

图 9C



圆的 RGD 邻接 CAM

图 9B



圆的 RGD 肿瘤

图 9A



对照肿瘤

图 10 A
对照 /



图 10 B
抗- α VB₅ (P3G2)

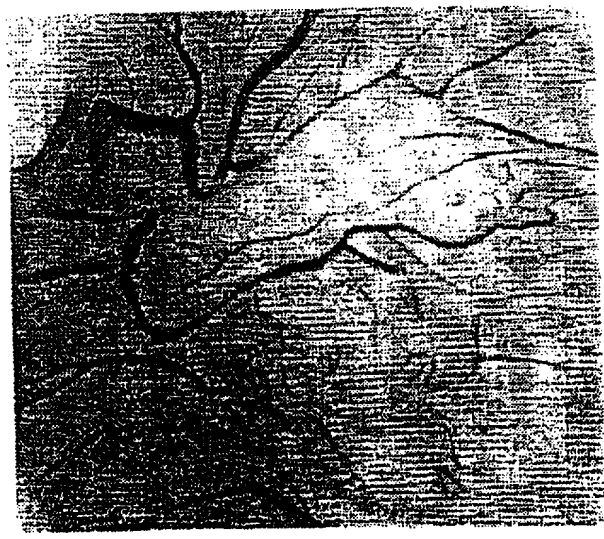


图 10 C
抗- α VB₃ (LM609)





图 11 A

抗- $\beta 1$

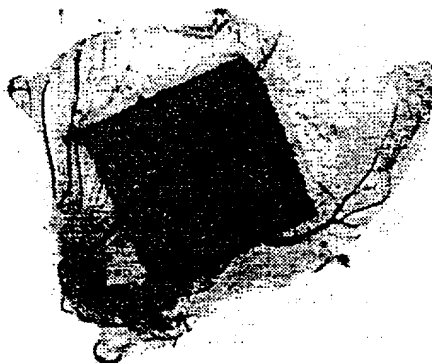


图 11 B

抗- $\alpha v \beta 5$

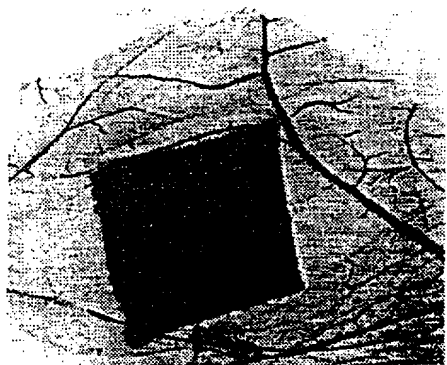


图 11 C

抗- $\alpha v \beta 3$

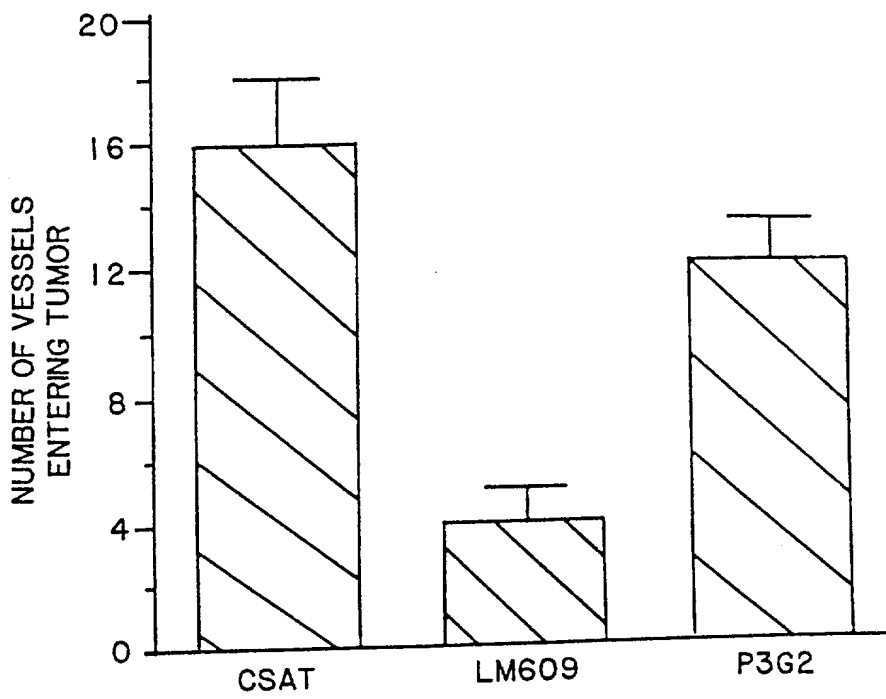


图 12

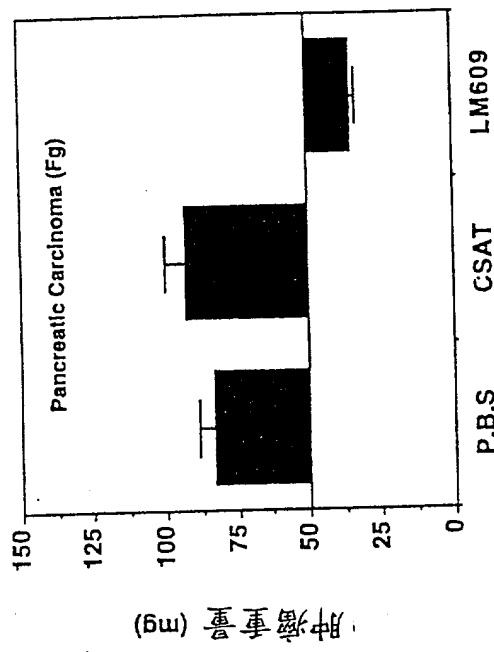


图 13 B

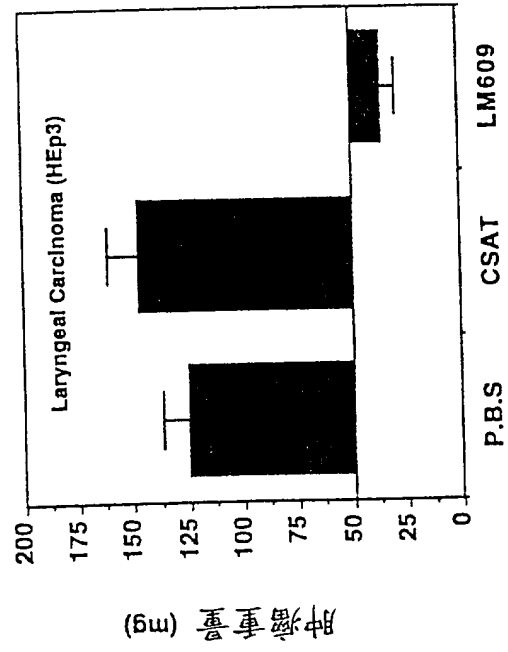


图 13 D

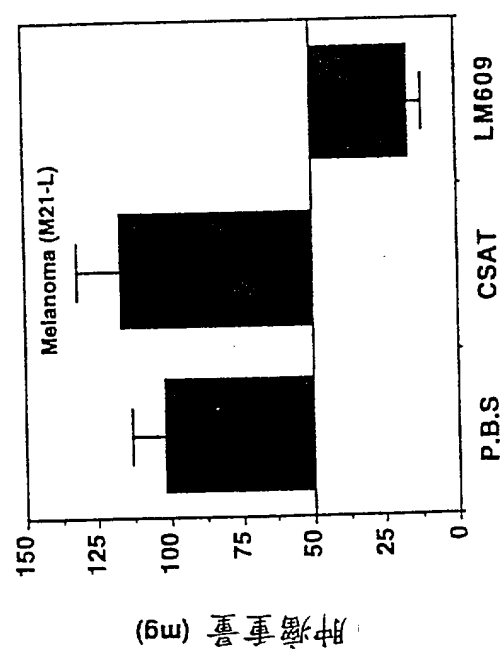


图 13 A

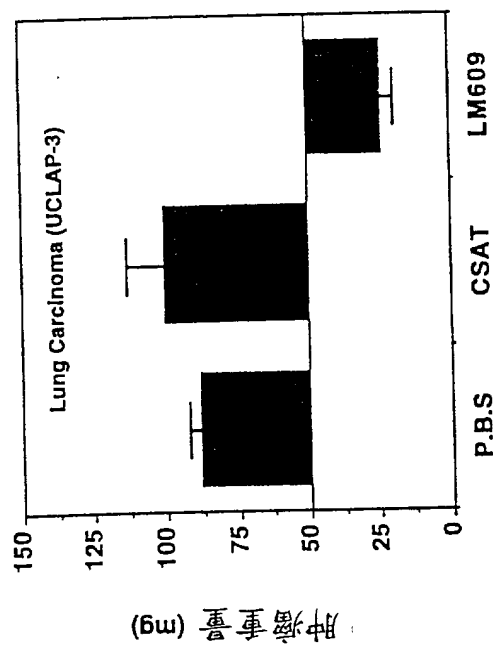
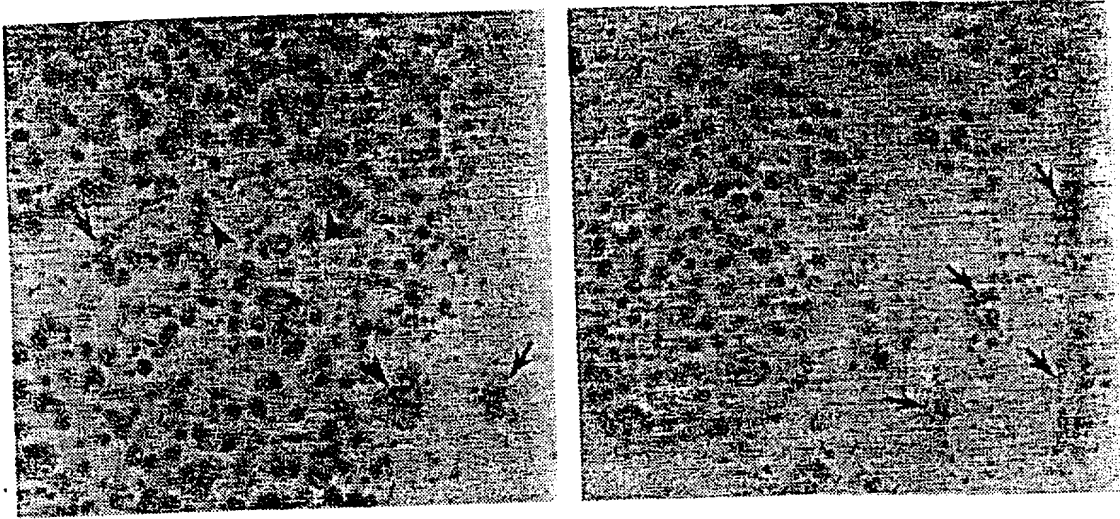


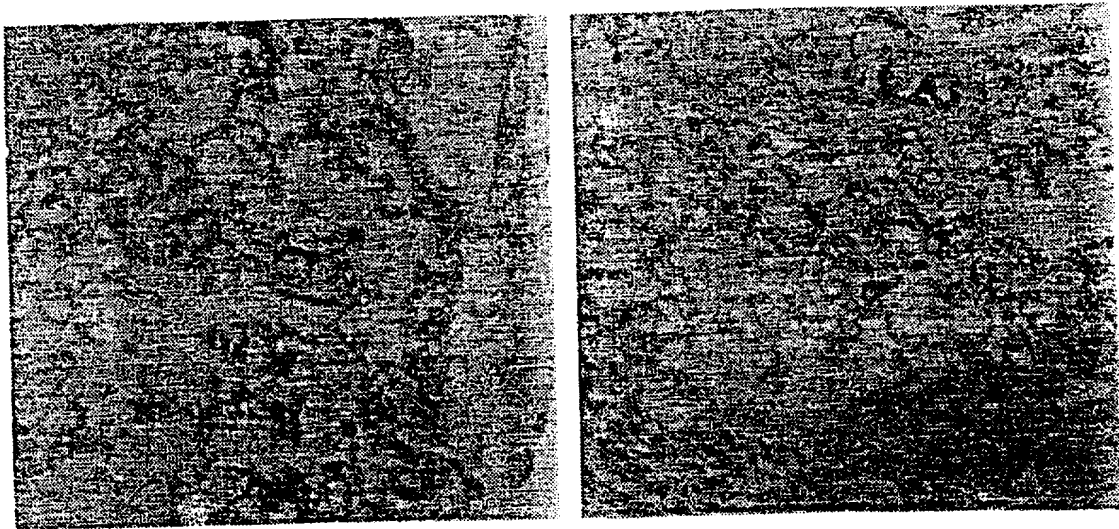
图 13 C

图 14 A



抗- $\alpha V\beta_5$
(P3G2)

图 14 B



抗- $\alpha V\beta_3$
(LM609)

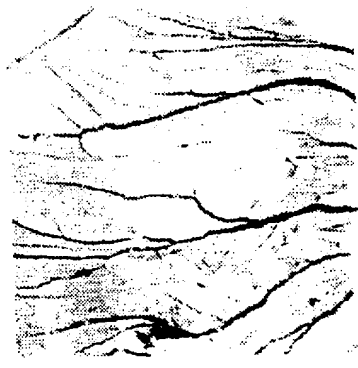
图 15 A



图 15 B



图 15 C



对照肽肿瘤



圆 RGD 肿瘤



圆 RGD 邻接 CAM



图 15 D

对照肽

图 15 E

环 RGD 肽

P1F6
(抗- $\alpha_v\beta_5$)

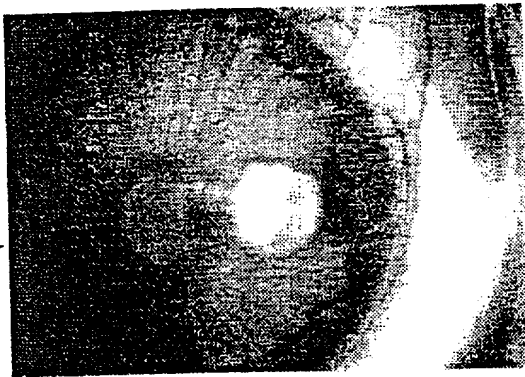


图 16 A

LM609
(抗- $\alpha_v\beta_3$)

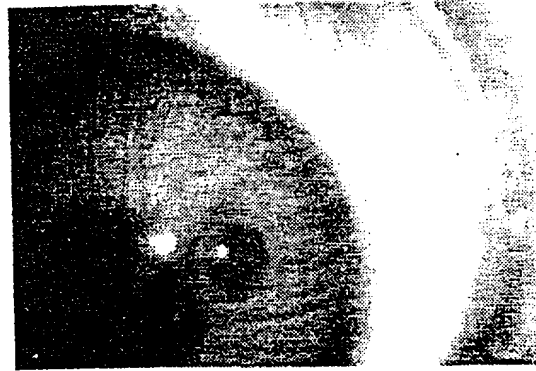


图 16 C

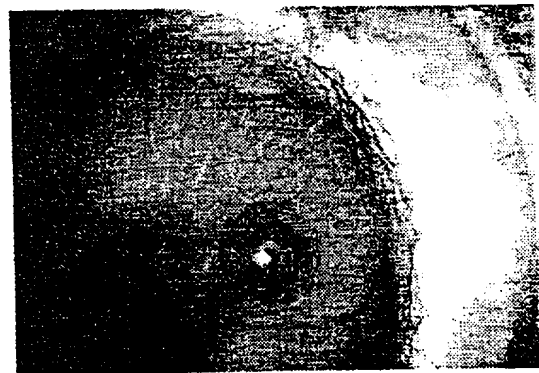


图 16 D



图 16 B

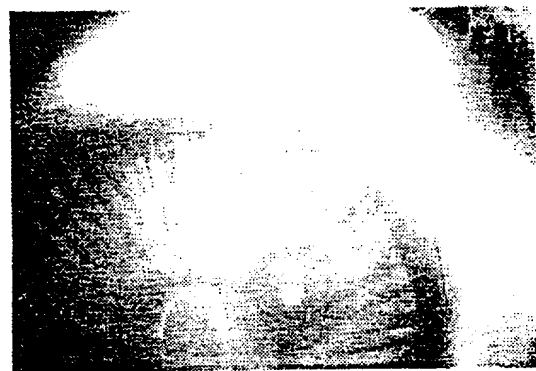


图 16 E

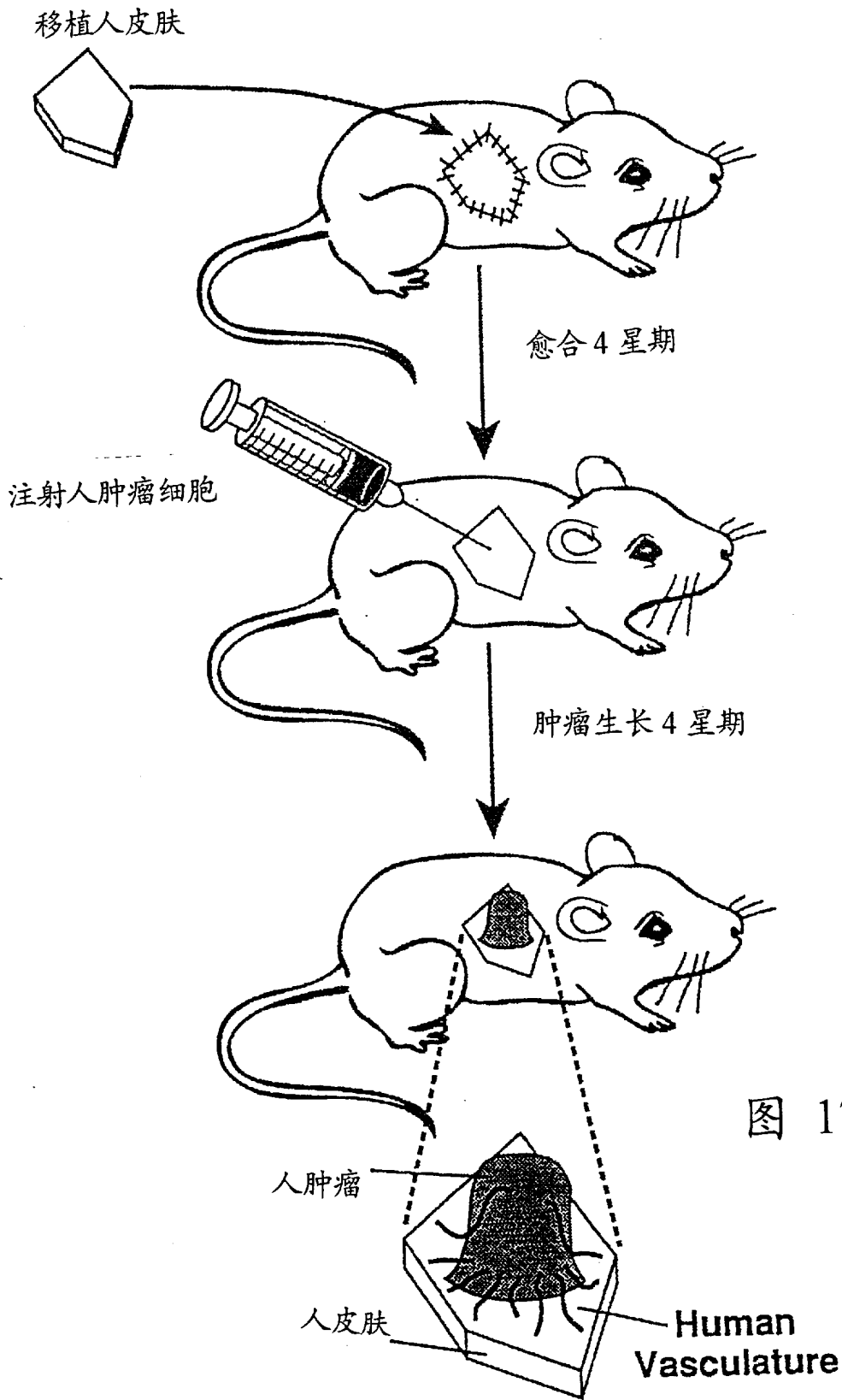


图 17

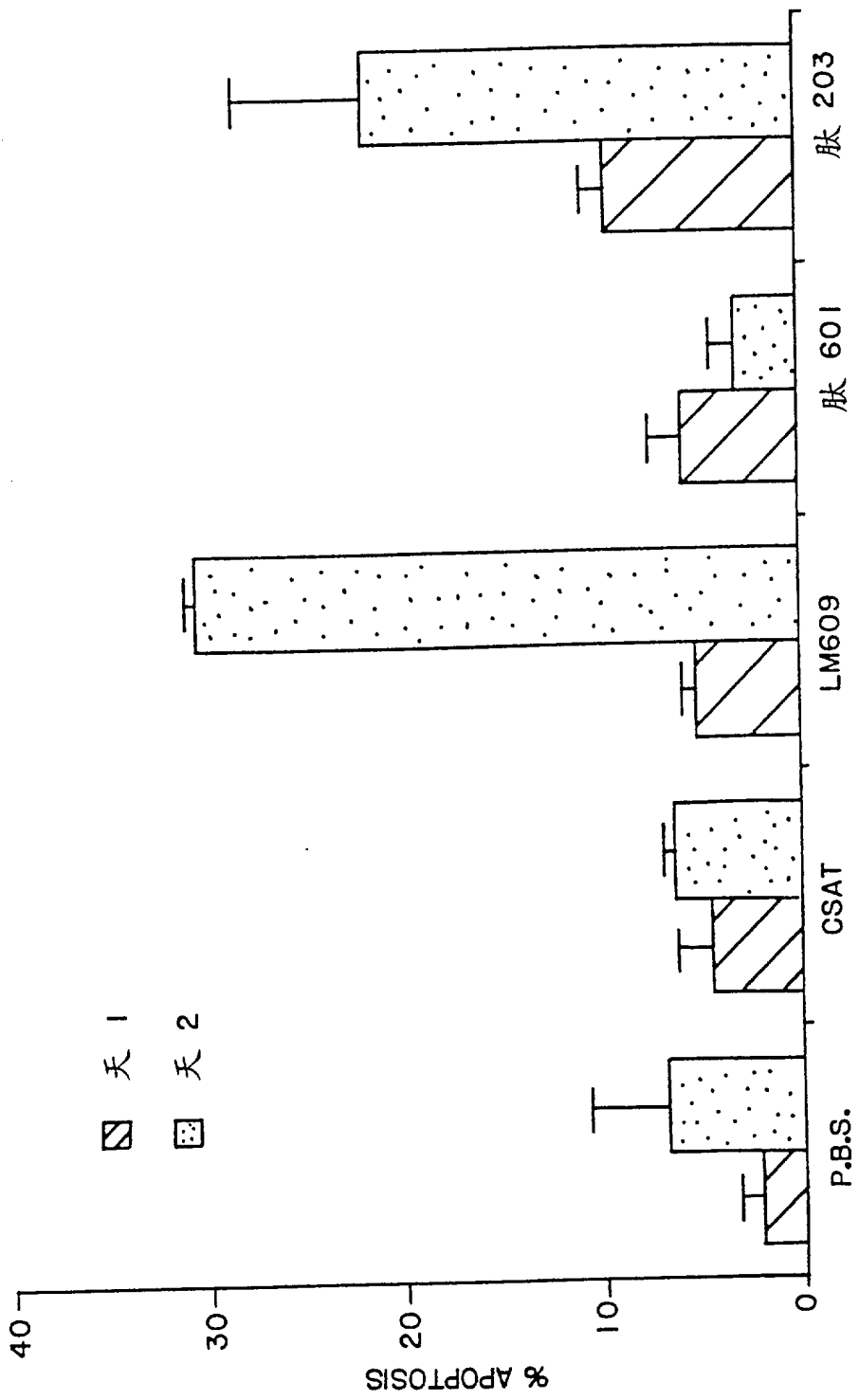


图 18

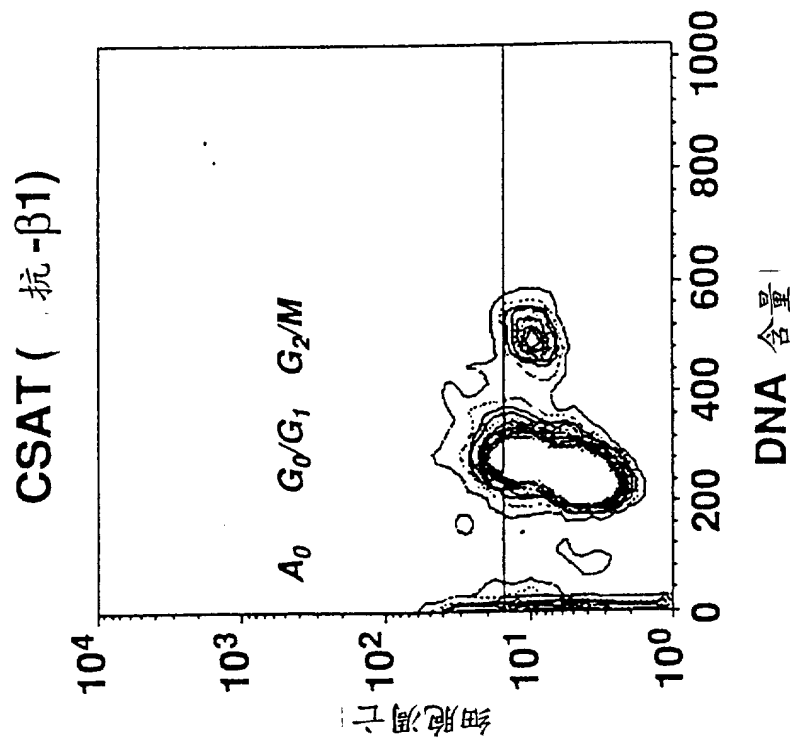
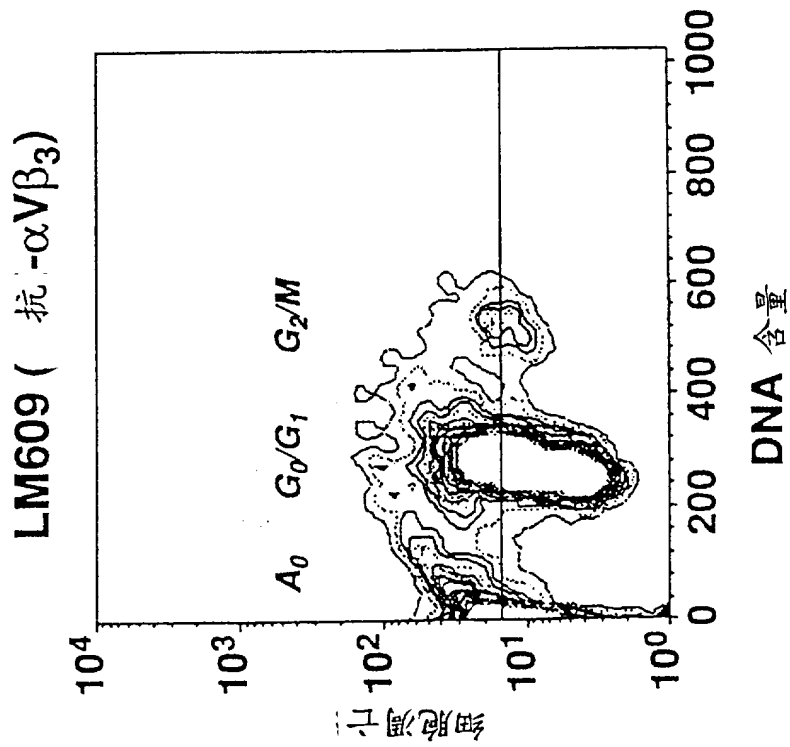


图 19

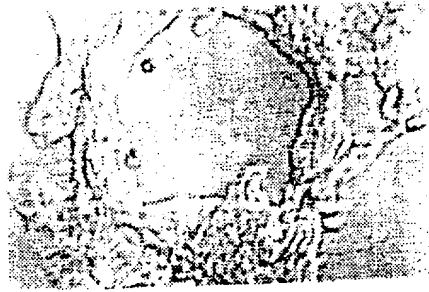


图 20 A

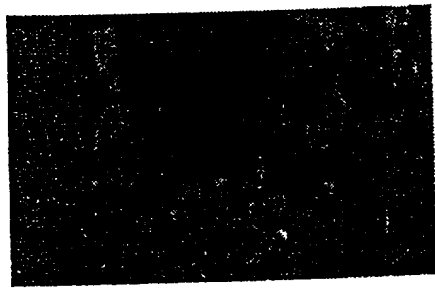


图 20 B

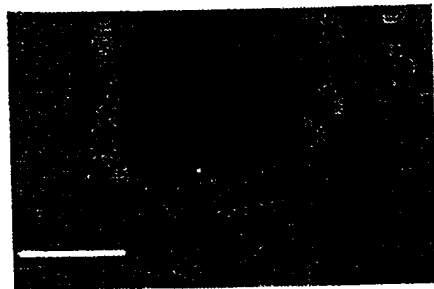


图 20 C



图 20 D

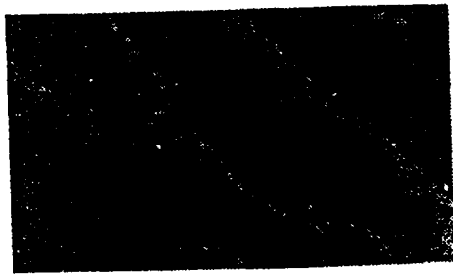


图 20 E

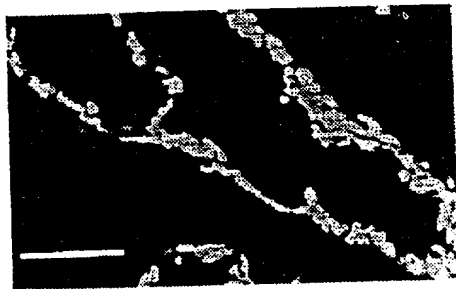


图 20 F