



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102711821 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 03

(21) 申请号 201080047972. 6

(22) 申请日 2010. 08. 20

(30) 优先权数据

61/235, 852 2009. 08. 21 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 04. 17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/046248 2010. 08. 20

(87) PCT申请的公布数据

W02011/022710 EN 2011. 02. 24

(71) 申请人 吉联亚生物科技有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 V·史密斯 P·范瓦拉西拉

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 余颖

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

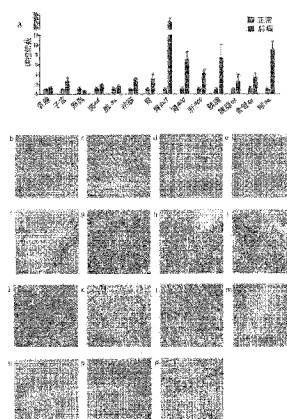
权利要求书 3 页 说明书 52 页 附图 14 页

(54) 发明名称

治疗方法和组合物

(57) 摘要

本文公开了通过抑制胞外酶赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的活性来调节肿瘤环境的方法。本文公开的方法在肿瘤中有效减少肿瘤生长、减少细胞募集到肿瘤、减少成纤维细胞激活、减少结缔组织形成、减少血管发生、减少 TAF 数量、减少生长因子生成、抑制胶原沉积, 并提高坏死及固缩。LOXL2 活性的示例性抑制剂是抗体和 siRNA。



1. 一种抑制肿瘤环境中成纤维细胞激活的方法,所述方法包括抑制赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的活性。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述成纤维细胞激活由转化生长因子- β (TGF- β) 信号传递介导。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述 LOXL2 活性抑制导致胞外基质破坏。
4. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于,所述胞外基质破坏导致肿瘤间质细胞的细胞骨架破裂。
5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述成纤维细胞是肿瘤相关成纤维细胞 (TAF)。
6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述成纤维细胞是肌成纤维细胞。
7. 一种抑制肿瘤环境中结缔组织形成的方法,所述方法包括抑制赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的活性。
8. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述肿瘤是转移性肿瘤。
9. 一种抑制肿瘤环境中血管发生的方法,所述方法包括抑制赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的活性。
10. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述血管发生包括募集血管细胞或血管细胞祖细胞到肿瘤环境。
11. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述血管发生包括血管分支。
12. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述血管发生包括血管长度增加。
13. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述血管发生包括血管数量增加。
14. 一种减少肿瘤间质中肿瘤相关成纤维细胞 (TAF) 数量的方法,所述方法包括抑制赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的活性。
15. 一种抑制肿瘤环境中胶原沉积的方法,所述方法包括抑制赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的活性。
16. 一种调节肿瘤环境的方法,所述方法包括抑制赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的活性。
17. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在于,所述调节包括结缔组织形成减少。
18. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在于,所述调节包括肿瘤相关成纤维细胞 (TAF) 数量减少。
19. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在于,所述调节包括肌成纤维细胞数量减少。
20. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在于,所述调节包括重构细胞的细胞骨架。
21. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,所述细胞是肿瘤细胞。
22. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,所述细胞是成纤维细胞。
23. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,所述细胞是内皮细胞。
24. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在于,所述调节包括肿瘤脉管系统减少。
25. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在于,所述调节包括胶原生成减少。
26. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在于,所述调节包括成纤维细胞激活减少。
27. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在于,所述调节包括抑制成纤维细胞募集到肿瘤环境中。
28. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在于,所述调节包括编码间质组分的基因表达

减少。

29. 如权利要求 28 所述的方法,其特征在于,所述间质组分选自下组: α 平滑肌肌动蛋白、I 型胶原、波形蛋白、基质金属蛋白酶 9 和纤连蛋白。

30. 一种调节肿瘤环境中生长因子生成的方法,所述方法包括抑制赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的活性。

31. 如权利要求 30 所述的方法,其特征在于,所述生长因子选自下组:血管内皮生长因子 (VEGF) 和间质细胞衍生因子 -1 (SDF-1)。

32. 一种增加肿瘤中坏死的方法,所述方法包括抑制赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的活性。

33. 一种增加肿瘤中固缩的方法,所述方法包括抑制赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的活性。

34. 如权利要求 1、7、9、14、15、16、30、32 或 33 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 LOXL2 的活性用抗 LOXL2 抗体抑制。

35. 如权利要求 34 所述的方法,其特征在于,所述抗体包括 SEQ ID NO:1 所列的重链序列和 SEQ ID NO:2 所列的轻链序列。

36. 如权利要求 34 所述的方法,其特征在于,所述抗体是人源化抗体。

37. 如权利要求 36 所述的方法,其特征在于,所述抗体包括 SEQ ID NO:3 所列的重链序列和 SEQ ID NO:4 所列的轻链序列。

38. 如权利要求 1、7、9、14、15、16、30、32 或 33 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 LOXL2 的活性用核酸抑制。

39. 如权利要求 38 所述的方法,其特征在于,所述核酸是 siRNA。

40. 一种鉴定 LOXL2 抑制剂的方法,所述方法包括分析测试分子调节肿瘤环境的能力。

41. 如权利要求 40 所述的方法,其特征在于,所述调节包括结缔组织形成减少。

42. 如权利要求 40 所述的方法,其特征在于,所述调节包括肿瘤相关成纤维细胞 (TAF) 数量减少。

43. 如权利要求 40 所述的方法,其特征在于,所述调节包括肌成纤维细胞数量减少。

44. 如权利要求 40 所述的方法,其特征在于,所述调节包括重构细胞的细胞骨架。

45. 如权利要求 44 所述的方法,其特征在于,所述细胞是肿瘤细胞。

46. 如权利要求 44 所述的方法,其特征在于,所述细胞是成纤维细胞。

47. 如权利要求 44 所述的方法,其特征在于,所述细胞是内皮细胞。

48. 如权利要求 40 所述的方法,其特征在于,所述调节包括肿瘤脉管系统减少。

49. 如权利要求 48 所述的方法,其特征在于,所述肿瘤脉管系统减少的证据是 CD31 和 / 或血管内皮生长因子 (VEGF) 水平降低。

50. 如权利要求 40 所述的方法,其特征在于,所述调节包括胶原生成减少和 / 或胶原交联程度降低。

51. 如权利要求 40 所述的方法,其特征在于,所述调节包括成纤维细胞激活减少。

52. 如权利要求 40 所述的方法,其特征在于,所述调节包括抑制成纤维细胞募集到肿瘤环境中。

53. 如权利要求 40 所述的方法,其特征在于,所述调节包括编码间质组分的基因的表

达减少。

54. 如权利要求 53 所述的方法,其特征在于,所述间质组分选自下组: α 平滑肌肌动蛋白、I 型胶原、波形蛋白、基质金属蛋白酶 9 和纤连蛋白。

55. 如权利要求 40 所述的方法,其特征在于,所述调节包括降低肿瘤环境中间质细胞衍生因子 -1 (SDF-1) 的水平。

56. 如权利要求 40 所述的方法,其特征在于,所述调节包括增加肿瘤细胞坏死和 / 或固缩的发生率。

57. 如权利要求 40 所述的方法,其特征在于,所述测试分子是分子量小于 1kD 的有机小分子。

58. 如权利要求 40 所述的方法,其特征在于,所述测试分子是多肽。

59. 如权利要求 58 所述的方法,其特征在于,所述多肽是抗体。

60. 如权利要求 40 所述的方法,其特征在于,所述测试分子是核酸。

61. 如权利要求 60 所述的方法,其特征在于,所述核酸是 siRNA。

治疗方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2009 年 8 月 21 日提交的美国临时专利申请第 61/235,852 号的权益,该专利申请通过引用全文纳入本文。

[0003] 本申请涉及美国临时专利申请第 61/235,846 号(2009 年 8 月 21 日提交)和美国临时专利申请第 61/235,796 号(2009 年 8 月 21 日提交),所述专利申请通过引用全文纳入本文用于所有目的。

[0004] 本申请也涉及名为“In vivo Screening Assays(体内筛选实验)”的共有美国专利申请,代理人案卷编号 ARBS-012,客户参考号 A12-US1;以及名为“In vitro Screening Assays(体外筛选实验)”的共有美国专利申请,代理人案卷编号 ARBS-013,客户参考号 A13-US1;这些申请各自在同一日期提交;所述专利申请通过引用全文纳入本文以用于所有目的。

[0005] 关于联邦资助的声明

[0006] 无。

技术领域

[0007] 本申请属于癌症、肿瘤和纤维变性疾病的领域。

背景技术

[0008] 肿瘤发生的广泛临床证据和小鼠模型支持微环境在促进肿瘤生长和转移中的关键作用。已显示通过肿瘤细胞募集和激活成纤维细胞、血管细胞和炎症细胞可促进转移潜能并能影响治疗结果。胰腺、乳腺、前列腺、结肠、肺和子宫的上皮性恶性肿瘤通常包含由肿瘤相关成纤维细胞(TAF)和积聚的胞外基质(matrix)构成的促结缔组织增生间质(stroma),其与预后较差相关联。认为这些 TAF 部分通过刺激肿瘤血管生成而有助于肿瘤发生。TAF 表现出肌成纤维细胞的平滑肌样收缩特性,这在引起纤维化的器官病理重构中起到重要作用。近期研究提供了改变微环境的因素在疾病进展中作用的进一步证据,表明胞外基质机械张力的改变可导致细胞形态、信号途径活化、组织重塑和病理的显著变化。这些发现凸显出新治疗策略能用于肿瘤学和纤维化,靶向那些调节胞外基质组成和机械性质的蛋白。

[0009] 赖氨酰氧化酶型酶(LOX/L)包括 5 种酶组成的家族,这些酶共有保守性 C 末端酶结构域与多样性 N 末端。LOX/L 是含铜的酶,其催化特定赖氨酸残基中 ϵ 氨基的氧化脱氨作用以促进蛋白共价交联,如促结缔组织生成间质主要成分胶原纤维 I 的共价交联。有证据显示某些 LOX/L 在肿瘤和纤维化疾病的起始和进展中起作用,并已表明赖氨酰氧化酶(LOX)在转移的发展和转移生境(metastatic niche)形成中起作用。参见例如,名为“Methods and compositions for treatment and diagnosis of fibrosis, tumor invasion, angiogenesis & metastasis(治疗和诊断纤维化、肿瘤侵袭、血管生成和转移的方法和组合物)”的共有美国专利申请公开号 US2009/0104201(2009 年 4 月 23 日),其通过

引用全文纳入本文用于描述赖氨酰氧化酶型酶的不同生物学方面的目的。

[0010] 赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) mRNA 在许多不同的实体肿瘤和肿瘤细胞系中高表达。据报道, LOXL2 在由 LOXL2 表达型癌细胞形成的乳腺肿瘤和胶质瘤中增强胶原体内积聚和沉积。先前已描述乳腺和食管癌、以及鳞状癌中的 LOXL2 蛋白的表达, 主要是胞内定位, 而近期报道支持分泌的 LOXL2 在促进胃癌中肿瘤细胞侵袭方面的作用。也已把 LOXL2 水平增加与退行性和纤维化疾病相关联, 例如在威尔逊氏病或原发性胆汁性肝硬化患者的肝细胞和肾小管间质纤维化中。

[0011] 发明概述

[0012] 本文中, 发明者鉴定了 LOXL2 在 (1) 产生肿瘤微环境和 (2) 成纤维细胞激活中的作用。

[0013] 由此, 本文提供了减少肿瘤和纤维化疾病中结缔组织形成和成纤维细胞激活的方法和组合物, 包括但不限于以下实施方式:

[0014] 1. 一种抑制肿瘤环境中成纤维细胞激活的方法, 所述方法包括抑制赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的活性。

[0015] 2. 如实施方式 1 所述的方法, 其中所述成纤维细胞激活由转化生长因子- β (TGF- β) 信号来介导。

[0016] 3. 如实施方式 1 所述的方法, 其中 LOXL2 活性的抑制导致胞外基质解体。

[0017] 4. 如实施方式 3 所述的方法, 其中胞外基质的解体导致肿瘤间质中细胞的细胞骨架破裂。

[0018] 5. 如实施方式 1 所述的方法, 其中所述成纤维细胞是肿瘤相关成纤维细胞 (TAF)。

[0019] 6. 如实施方式 1 所述的方法, 其中所述成纤维细胞是肌成纤维细胞。

[0020] 7. 一种抑制肿瘤环境中结缔组织形成的方法, 所述方法包括抑制赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的活性。

[0021] 8. 如实施方式 7 所述的方法, 其中所述肿瘤是转移性肿瘤。

[0022] 9. 一种抑制肿瘤环境中血管发生的方法, 所述方法包括抑制赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的活性。

[0023] 10. 如实施方式 9 所述的方法, 其中所述血管发生包括将血管细胞或血管细胞祖细胞募集到肿瘤环境。

[0024] 11. 如实施方式 9 所述的方法, 其中所述血管发生包括血管分支。

[0025] 12. 如实施方式 9 所述的方法, 其中所述血管发生包括血管长度增加。

[0026] 13. 如实施方式 9 所述的方法, 其中所述血管发生包括血管数量增加。

[0027] 14. 一种减少肿瘤间质中肿瘤相关成纤维细胞 (TAF) 数量的方法, 所述方法包括抑制赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的活性。

[0028] 15. 一种抑制肿瘤环境中胶原沉积的方法, 所述方法包括抑制赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的活性。

[0029] 16. 一种调节肿瘤环境的方法, 所述方法包括抑制赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的活性。

[0030] 17. 如实施方式 16 所述的方法, 其中所述调节包括结缔组织形成减少。

[0031] 18. 如实施方式 16 所述的方法, 其中所述调节包括肿瘤相关成纤维细胞 (TAF) 数

量减少。

- [0032] 19. 如实施方式 16 所述的方法,其中所述调节包括肌成纤维细胞数量减少。
- [0033] 20. 如实施方式 16 所述的方法,其中所述调节包括重构细胞的细胞骨架。
- [0034] 21. 如实施方式 20 所述的方法,其中所述细胞是肿瘤细胞。
- [0035] 22. 如实施方式 20 所述的方法,其中所述细胞是成纤维细胞。
- [0036] 23. 如实施方式 20 所述的方法,其中所述细胞是内皮细胞。
- [0037] 24. 如实施方式 16 所述的方法,其中所述调节包括肿瘤脉管系统减少。
- [0038] 25. 如实施方式 16 所述的方法,其中所述调节包括胶原生成减少。
- [0039] 26. 如实施方式 16 所述的方法,其中所述调节包括成纤维细胞激活减少。
- [0040] 27. 如实施方式 16 所述的方法,其中所述调节包括抑制成纤维细胞募集到肿瘤环境中。
- [0041] 28. 如实施方式 16 所述的方法,其中所述调节包括编码间质组分的基因表达降低。
- [0042] 29. 如实施方式 28 所述的方法,其中所述间质组分选自下组: α 平滑肌肌动蛋白、I 型胶原、波形蛋白、基质金属蛋白酶 9 和纤连蛋白。
- [0043] 30. 一种调节肿瘤环境中生长因子生成的方法,所述方法包括抑制赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的活性。
- [0044] 31. 如实施方式 30 所述的方法,其中所述生长因子选自下组:血管内皮生长因子 (VEGF) 和间质细胞衍生因子 -1 (SDF-1)。
- [0045] 32. 一种提高肿瘤中坏死的方法,所述方法包括抑制赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的活性。
- [0046] 33. 一种提高肿瘤中固缩的方法,所述方法包括抑制赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 的活性。
- [0047] 34. 如实施方式 1、7、9、14、15、16、30、32 或 33 中任一项所述的方法,其中所述 LOXL2 的活性用抗 LOXL2 抗体抑制。
- [0048] 35. 如实施方式 34 所述的方法,其中所述抗体包括 SEQ ID NO :1 所列的重链序列和 SEQ ID NO :2 所列的轻链序列。
- [0049] 36. 如实施方式 34 所述的方法,其中所述抗体是人源化抗体。
- [0050] 37. 如实施方式 36 所述的方法,其中所述抗体包括 SEQ ID NO :3 所列的重链序列和 SEQ ID NO :4 所列的轻链序列。
- [0051] 38. 如实施方式 1、7、9、14、15、16、30、32 或 33 中任一项所述的方法,其中所述 LOXL2 的活性用核酸抑制。
- [0052] 39. 如实施方式 38 所述的方法,其中所述核酸是 siRNA。
- [0053] 40. 一种鉴定 LOXL2 抑制剂的方法,所述方法包括分析测试分子调节肿瘤环境的能力。
- [0054] 41. 如实施方式 40 所述的方法,其中所述调节包括结缔组织形成减少。
- [0055] 42. 如实施方式 40 所述的方法,其中所述调节包括肿瘤相关成纤维细胞 (TAF) 数量减少。
- [0056] 43. 如实施方式 40 所述的方法,其中所述调节包括肌成纤维细胞数量减少。

- [0057] 44. 如实施方式 40 所述的方法,其中所述调节包括重构细胞的细胞骨架。
- [0058] 45. 如实施方式 44 所述的方法,其中所述细胞是肿瘤细胞。
- [0059] 46. 如实施方式 44 所述的方法,其中所述细胞是成纤维细胞。
- [0060] 47. 如实施方式 44 所述的方法,其中所述细胞是内皮细胞。
- [0061] 48. 如实施方式 40 所述的方法,其中调节包括肿瘤脉管系统减少。
- [0062] 49. 如实施方式 48 所述的方法,其中肿瘤脉管系统减少由 CD31 和 / 或血管内皮生长因子 (VEGF) 的水平降低证明。
- [0063] 50. 如实施方式 40 所述的方法,其中所述调节包括胶原生成减少和 / 或胶原交联程度降低。
- [0064] 51. 如实施方式 40 所述的方法,其中所述调节包括成纤维细胞激活减少。
- [0065] 52. 如实施方式 40 所述的方法,其中所述调节包括抑制成纤维细胞募集到肿瘤环境中。
- [0066] 53. 如实施方式 40 所述的方法,其中所述调节包括编码间质组分的基因表达降低。
- [0067] 54. 如实施方式 53 所述的方法,其中所述间质组分选自下组: α 平滑肌肌动蛋白、I 型胶原、波形蛋白、基质金属蛋白酶 9 和纤连蛋白。
- [0068] 55. 如实施方式 40 所述的方法,其中所述调节包括降低肿瘤环境中间质细胞衍生因子 -1 (SDF-1) 的水平。
- [0069] 56. 如实施方式 40 所述的方法,其中所述调节包括提高肿瘤细胞坏死和 / 或固缩的发生率。
- [0070] 57. 如实施方式 40 所述的方法,其中所述测试分子是分子量小于 1kD 的有机小分子。
- [0071] 58. 如实施方式 40 所述的方法,其中所述测试分子是多肽。
- [0072] 59. 如实施方式 58 所述的方法,其中所述多肽是抗体。
- [0073] 60. 如实施方式 40 所述的方法,其中所述测试分子是核酸。
- [0074] 61. 如实施方式 60 所述的方法,其中所述核酸是 siRNA。
- [0075] 62. 一种用于抑制肿瘤环境中成纤维细胞激活的 LOXL2 抑制剂。
- [0076] 63. 一种用于抑制肿瘤环境中结缔组织形成的 LOXL2 抑制剂。
- [0077] 64. 一种用于抑制肿瘤环境中血管发生的 LOXL2 抑制剂。
- [0078] 65. 一种用于减少肿瘤间质中肿瘤相关成纤维细胞 (TAF) 数量的 LOXL2 抑制剂。
- [0079] 66. 一种用于抑制肿瘤环境中胶原沉积的 LOXL2 抑制剂。
- [0080] 67. 一种用于调节肿瘤环境的 LOXL2 抑制剂。
- [0081] 68. 一种用于调节肿瘤环境中生长因子生成的 LOXL2 抑制剂。
- [0082] 69. 一种用于提高肿瘤中坏死的 LOXL2 抑制剂。
- [0083] 70. 一种用于提高肿瘤中固缩的 LOXL2 抑制剂。
- [0084] 71. 如实施方式 62-70 中任一项所述的抑制剂,其中所述 LOXL2 抑制剂是抗 LOXL2 抗体。
- [0085] 72. 如实施方式 71 所述的抑制剂,其中所述抗体包括 SEQ ID NO :1 所列的重链序列和 SEQ ID NO :2 所列的轻链序列。

- [0086] 73. 如实施方式 71 所述的抑制剂,其中所述抗体是人源化抗体。
- [0087] 74. 如实施方式 73 所述的抑制剂,其中所述抗体包括 SEQ ID NO:3 所列的重链序列和 SEQ ID NO:4 所列的轻链序列。
- [0088] 75. 如实施方式 62-70 中任一项所述的抑制剂,其中所述抑制剂是核酸。
- [0089] 76. 如实施方式 75 所述的抑制剂,其中所述核酸是 siRNA。
- [0090] 77. 一种用于抑制肿瘤环境中成纤维细胞激活的药物组合物,其中所述组合物包括 LOXL2 抑制剂和药学上可接受的赋形剂。
- [0091] 78. 一种用于抑制肿瘤环境中结缔组织形成的药物组合物,其中所述组合物包括 LOXL2 抑制剂和药学上可接受的赋形剂。
- [0092] 79. 一种用于抑制肿瘤环境中血管发生的药物组合物,其中所述组合物包括 LOXL2 抑制剂和药学上可接受的赋形剂。
- [0093] 80. 一种用于减少肿瘤间质中肿瘤相关成纤维细胞 (TAF) 数量的药物组合物,其中所述组合物包括 LOXL2 抑制剂和药学上可接受的赋形剂。
- [0094] 81. 一种用于抑制肿瘤环境中胶原沉积的药物组合物,其中所述组合物包括 LOXL2 抑制剂和药学上可接受的赋形剂。
- [0095] 82. 一种用于调节肿瘤环境的药物组合物,其中所述组合物包括 LOXL2 抑制剂和药学上可接受的赋形剂。
- [0096] 83. 一种用于调节肿瘤环境中生长因子生成的药物组合物,其中所述组合物包括 LOXL2 抑制剂和药学上可接受的赋形剂。
- [0097] 84. 一种用于提高肿瘤中坏死的药物组合物,其中所述组合物包括 LOXL2 抑制剂和药学上可接受的赋形剂。
- [0098] 85. 一种用于提高肿瘤中固缩的药物组合物,其中所述组合物包括 LOXL2 抑制剂和药学上可接受的赋形剂。
- [0099] 86. 如实施方式 77-85 中任一项所述的组合物,其中所述 LOXL2 抑制剂是抗 LOXL2 抗体。
- [0100] 87. 如实施方式 86 所述的组合物,其中所述抗体包括 SEQ ID NO:1 所列的重链序列和 SEQ ID NO:2 所列的轻链序列。
- [0101] 88. 如实施方式 86 所述的组合物,其中所述抗体是人源化抗体。
- [0102] 89. 如实施方式 88 所述的组合物,其中所述抗体包括 SEQ ID NO:3 所列的重链序列和 SEQ ID NO:4 所列的轻链序列。
- [0103] 90. 如实施方式 77-85 中任一项所述的组合物,其中所述抑制剂是核酸。
- [0104] 91. 如实施方式 90 所述的组合物,其中所述核酸是 siRNA。
- [0105] 附图简要说明

[0106] 图 1 中 a-p 小图显示 LOXL2 在实体肿瘤和肝纤维化中高表达且分泌。图 1 的 a 小图显示 LOXL2 转录物在实体肿瘤中与非肿瘤组织相比的 qRT-PCR 分析。图 1 的 b 和 c 小图显示喉鳞状细胞癌匹配肿瘤切片中的 I 型胶原 (图 1b) 和 LOXL2 (图 1c) 表达的免疫组化 (IHC)。图 1 的 d 和 e 小图显示来自肺鳞状细胞癌 (2 级) 切片的 IHC 分析,测试 I 型胶原 (图 1,d 小图) 和 LOXL2 (图 1,e 小图) 的表达。图 1 的 f 和 g 小图显示胰腺癌 (3 级) 切片中 LOXL2 表达的 IHC 分析。图 1 的 f 小图显示基质和肿瘤间质边缘中的 LOXL2 表达;而

图 1 的 f 小图和图 1 的 g 小图中也显见血管球结构上的 LOXL2 表达。图 1 的 h 和 i 小图显示卵巢癌网膜转移中 LOXL2 表达的 IHC 分析。图 1 的 h 小图显示肿瘤细胞表达,图 1 的 i 小图显示血管球结构中的 LOXL2 表达。图 1 的 j 和 k 小图显示胰腺癌切片的 IHC。图 1 的 j 小图显示 LOXL2 表达,图 1 的 k 小图显示 LOX 表达。图 1 的 l 小图显示肾透明细胞癌切片的 LOXL2 表达。图 1 的 m 小图和 1n 显示活性丙肝引起肝纤维化中 LOXL2 表达的 IHC(图 1 的 m 小图:5X 放大;图 1 的 n 小图:40X 放大)。图 1 的 o 和 p 小图分别显示脂肪肝切片的 LOXL2 和 LOX 表达的 IHC(40X 放大)。

[0107] 图 2 的 a-f 小图显示分泌的 LOXL2 在体外促进肿瘤细胞侵袭。图 2 的 a 和 b 小图显示 Hs578t 肿瘤细胞培养物的 LOXL2(图 2 的 a 小图)和 I 型胶原(图 2 的 b 小图)共染色的免疫荧光分析。I 型胶原和 LOXL2 的表达共定位在这些培养物的胞外基质中。图 2 的 c-f 小图显示,用以下培养基:MCF7 条件培养基(图 2 的 c 小图)、MDA-MB231 条件培养基(图 2 的 d 小图)、用 4ug 抗 IgG 抗体预孵育的 MDA-MB231 条件培养基(图 2 的 e 小图)或用 4ug 抗 LOXL2 抗体 AB0023 预孵育的 MDA-MB231 条件培养基(图 2 的 f 小图),处理培养的 MCF-7 细胞后,MCF-7 细胞培养物的罗丹明鬼笔环肽染色。

[0108] 图 3 的 a-k 小图显示 LOXL2 在体外和体内促进成纤维细胞激活。图 3 的 a 小图显示蛋白(“Western”)印迹分析,测试张力对人包皮成纤维细胞(HFF)中 LOXL2 表达水平的影响。在细胞培养板(标为 1 的泳道)、0.2%双丙烯酰胺交联胶原包被的凝胶(标为 2 的泳道)、或 0.8%双丙烯酰胺交联胶原包被的凝胶(标为 3 的泳道)上培养细胞。图 3 的 b 和 e 小图显示用非靶向 siRNA(图 3, b 小图)或 LOXL2siRNA(图 3, c 小图)转染且转染后 10 天染色 I 型胶原的 HFF 细胞的照片。图 3 的 d 和 e 小图显示用非靶向 siRNA(图 3, d 小图)或 LOXL2siRNA(图 3, e 小图)转染且转染后 10 天进行罗丹明鬼笔环肽染色的 HFF 细胞的照片。图 3 的 f 和 g 小图显示低张力(图 3 的 f 小图)或高张力(图 3 的 g 小图)下生长然后用罗丹明鬼笔环肽染色的 HFF 细胞的照片。图 3 的 h 小图显示 HFF 细胞溶解物的蛋白(“Western”)印迹,所述细胞来自与 MDA-MD-231 或 MCF7-LOXL2 细胞的微孔膜(transwell)培养。图 3 的 i 小图显示通过光密度测定对图 3 的 h 小图所示结果的定量,表明对 pSMAD2 和 VEGF 表达的 AB0023 特异性影响。图 3 的 j 小图显示 nu/nu 小鼠肾被膜下产生的异种移植物大小比较,所述小鼠植入 MCF7 细胞(MCF7-对照)或稳定转染有 LOXL2 表达载体的 MCF7 细胞(MCF7-LOXL2)。图 3 的 k 小图显示异种移植物的定量 RT-PCR 分析,以检测表达 LOXL2 的肿瘤中各种间质组分的相对诱导。采用小鼠特异性引物区分间质表达与移植(人)细胞中的表达。aSMA = α 平滑肌肌动蛋白;COL1A1 = I 型胶原;MMP9 = 基质金属蛋白酶 9;FN1 = 纤连蛋白 1 型;VIM = 波形蛋白。间质中 MCF7-LOXL2 诱导肿瘤与 MCF7 诱导肿瘤相比的激活倍数由代表各基因的柱上方的数字显示。

[0109] 图 4 的 a-o 小图显示抗 LOXL2 抗体 AB0023 体外和体内抑制血管生成和血管发生的示例。图 4 的 a 和 b 小图显示 HUVEC 细胞的罗丹明鬼笔环肽染色,所述细胞用非靶向 siRNA(图 4, a 小图)或靶向 LOXL2 的 siRNA(图 4, b 小图)转染,随后培养 10 天。图 4 的 c-i 小图显示体外血管形成实验的结果,其中培养中的人类脐静脉内皮细胞(HUVEC)用递增浓度的 AB0023 处理,然后染色内皮标记 CD31。4 张小图显示没有抗体(图 4, c 小图)或存在 1ug/ml(图 4, d 小图)、10ug/ml(图 4, e 小图)或 50ug/ml(图 4, f 小图)AB0023 时培养的 HUVEC。还进行分支点平均数(图 4, g 小图)、血管平均数(图 4, h 小图)和平均总管长

(图 4, i 小图) 的定量。图 4 的 j-m 小图显示 Matrigel™ 胶栓分析中抗 LOXL2 抗体 AB0023 对血管生成的影响。Balb/C 小鼠肺部植入含 bFGF 的 Matrigel™ 胶栓, 然后用 AB0023 或载剂 (PBST) 处理。移植后第 10 天, 仅用载剂处理的动物中胶栓的组织学分析 (H&E 染色) 显示分支和侵袭脉管系统 (图 4 的 j 小图), 这在 AB0023 处理动物的胶栓中几乎没有 (图 4 的 k 小图)。用单独载剂 (图 4 的 l 小图) 和 AB0023 (图 4 的 m 小图) 所处理动物的胶栓的 CD31 染色提供了类似结果, 即 AB0023 处理动物的胶栓中缺乏血管发生。图 4 的 n 小图提供了载剂处理和 AB0023 处理动物的胶栓中平均血管数的定量分析, 表明 AB0023 处理小鼠中血管发生减少 ~ 7 倍 ($p = 0.0319$)。图 4 的 o 小图显示载剂处理和 AB0023 处理小鼠的胶栓中 CD31 阳性细胞的定量, 确证血管发生减少 ($p = 0.0168$)。

[0110] 图 5 的 a-u 小图显示在原发性肿瘤和癌的转移性异种移植模型中抗 LOXL2 抗体 AB0023 都在体内有效减少间质激活且抑制肿瘤环境的产生。对于图 5 的 a 和 b 小图所示结果, 将约 10^6 MDA-MB231 细胞注入小鼠 (左心室) 以产生弥散型骨转移模型, 注射后 28 天, 评价肿瘤负荷。用抗 LOX 抗体 M64、抗 LOXL2 抗体 AB0023、多西他赛 (Taxotere) 或载剂对照处理注射的动物。图 5 的 a 小图显示第 28 天股骨中的肿瘤细胞负荷 (AB0023 $p = 0.0021$, M64 $p = 0.5262$); 图 5 的 b 小图显示第 28 天总腹部骨中的肿瘤细胞负荷 (AB0023 $p = 0.0197$, M64 $p = 0.5153$)。

[0111] 对于图 5 的 c-m 小图所示的结果, 用 MDA-MB-435 细胞系产生原发性肿瘤并如所述处理。对此模型系统中仅用载剂处理的宿主动物中所产生肿瘤的切片进行 LOXL2 (图 5, c 小图) 和 LOX (图 5, d 小图) 表达染色。图 5 的 e 小图显示用单独载剂、多西他赛 (肿瘤体积减小的阳性对照)、抗 LOXL2 抗体 AB0023 和抗 LOX 抗体 M64 处理小鼠的肿瘤体积测量。AB0023 处理的小鼠保持肿瘤体积显著减小 (在第 3 周为 45%, $p = 0.001$; 第 5 周为 33%, $p = 0.0240$), 而 M64 处理的小鼠不保持 (在第 3 周为 27%, $p = 0.040$; 第 5 周不显著)。图 5 的 f-i 小图显示载剂处理 (图 5, f 小图)、AB0023 处理 (图 5, g 小图)、M64 处理 (图 5, h 小图) 和多西他赛处理 (图 5, i 小图) 动物的肿瘤的天狼星红 (Sirius Red) 染色示例。图 5 的 j-m 小图显示用单独载剂 (图 5, j 小图)、AB0023 (图 5, k 小图)、M64 (图 5, l 小图) 和多西他赛 (图 5, m 小图) 处理动物所得肿瘤切片中 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 表达的 IHC 分析。图 5n 显示 MDA-MB-435 诱导肿瘤的肿瘤环境中天狼星红染色、 α -SMA 表达和 CD31 表达的定量。结果表明 AB0023 处理小鼠中由天狼星红染色所测定的交联胶原减少 61% ($p = 0.0027$), 由 α -SMA 表达所评价的 TAF 存在减少 88% ($p = 0.011$), 由 CD31 表达所评价的肿瘤脉管系统减少 74% ($p = 0.0002$)。

[0112] 图 5 的 o 小图显示 AB0023 和 BAPN 处理小鼠中 MDA-MB-435 诱导的原发性肿瘤的肿瘤体积的单独研究结果; 表明抗 LOXL2 抗体处理后肿瘤体积在统计上显著减小。图 5 的 p 小图显示 AB0023 和 BAPN 处理小鼠的 MDA-MB-435 诱导肿瘤中的天狼星红染色 (胶原生成)、CD31 表达 (血管发生) 和 α -SMA 表达 (成纤维细胞激活) 的定量分析; 表明在 AB0023 处理小鼠中所有 3 种标记都减少。图 5 的 q 小图显示 AB0023 处理和对照 (载剂处理) 小鼠的 MDA-MB-435 诱导肿瘤中 LOXL2、VEGF 和 SDF-1 表达的分析; 表明 AB0023 处理的 MDA-MB-435 肿瘤中 VEGF 水平降低 76% ($p = 0.0001$), SDF1 水平降低 80% ($p = 0.0200$), LOXL2 水平降低 55% ($p = 0.0005$)。

[0113] 图 5 的 r 和 s 小图提供了 AB0023 处理的 MDA-MB-435 肿瘤中坏死的证据。图 5 的

r 小图显示 AB0023 处理的 MDA-MB-435 肿瘤切片中肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的 IHC 分析。图 5 的 s 小图显示 AB0023 处理的 MDA-MB-435 肿瘤切片的苏木精与伊红 (H&E) 染色。图 5t 和 5u 提供了 AB0023 处理的 MDA-MB-435 肿瘤中固缩的证据。载剂处理的肿瘤切片中核轮廓分明 (图 5, t 小图), AB0023 处理的肿瘤切片中核出现固缩 (图 5, u 小图)。

[0114] 图 6 的 a-e 小图显示 AB0023 介导的对 CCl_4 诱发的肝纤维化和肌成纤维细胞激活的抑制。图 6 的 a 小图显示 CCl_4 处理小鼠又用抗 LOXL2 抗体 AB0023、抗 LOX 抗体 M64 或载剂处理的 K-M 生存分析 (Kaplan Meier survival analysis)。存活率的显著提高在 AB0023 治疗方式中显见 (对数秩次检验中 $p = 0.0029$, 或曼泰尔-卡克斯 (Mantel-Cox) 检验中 $p = 0.0064$)。图 6 的 b 小图显示 AB0023 处理小鼠的肝中桥接纤维化量显著减少 ($p = 0.0020$)。图 6 的 c 和 d 小图显示载剂处理小鼠的肝门区切片中 α -SMA 的 IHC 分析 (图 6, c 小图), 与 AB0023 处理小鼠的肝作比较 (图 6, d 小图)。图 6 的 e 小图提供 α -SMA 信号的定量分析, 证明 AB0023 处理动物的肝中桥接纤维化缺乏伴有 α -SMA 阳性肌成纤维细胞量显著减少 ($p = 0.0260$)。

[0115] 图 7 的 a-z 小图显示各种人肿瘤和正常组织中 LOXL2 表达的证据。(a-f 小图) 对人结肠腺癌 (a 小图)、胰腺癌 (b 小图)、子宫腺癌 (c 小图)、肾细胞癌 (d 小图)、胃腺癌 (e 小图) 和喉咽鳞状细胞癌 (f 小图) 进行 LOXL2 转录物的定量 RT-PCR 分析; 观察到 LOXL2 转录物随着肿瘤级别提高而增加的趋势。(g-y 小图) 各种 LOX/L 的蛋白质印迹分析显示用于人和小鼠组织切片 IHC 的多克隆抗体特异于 LOXL2 (g 小图, cLOX = 成熟 LOX, 前肽切割; MCD = 仅蛋白催化结构域; FL = 全长蛋白; 此特异性也由 ELISA 确认 (数据未显示))。图中其它 LOXL2 表达示例为: 乳腺浸润性导管癌 (h 小图)、子宫内膜癌 (i 小图)、结肠腺癌 (j 小图)、肝细胞癌 (k 小图, 也对 LOX 表达染色 (l 小图))、胰腺神经内分泌癌 (m 小图, 也对 LOX 表达染色 (n 小图))、黑素瘤 (o 小图)、正常心脏 (p 小图, 也用 CD31 染色 (q 小图))、正常肝 (r 小图)、正常肺 (s 小图, 也用 CD31 染色 (t 小图))、正常卵巢 (u 小图)、正常脾 (v 小图)、正常平滑肌 (x 小图, 也对 LOX 表达染色 (w 小图)) 和正常动脉 (z 小图, 也对 LOX 表达染色 (y 小图))。图 1 的表 7 总结了人健康组织中的 LOXL2 表达。用抗 LOXL2 多克隆抗体染色人正常组织, 汇编对 LOXL2 相对表达水平的定性评估。

[0116] 图 8 的 a-t 小图显示分泌的 LOXL2 在体外促进肿瘤细胞的重构和侵袭。(a 小图) 各种肿瘤和成纤维细胞系中的 LOXL2 转录物 (常氧条件, RPL19 用作参比) 的 qRT-PCR 分析 (Ct 值)。(b 小图) 人肿瘤和成纤维细胞系中 LOXL2 表达的蛋白质分析 (全细胞团 = 细胞; 条件培养基 = CM)。(c 小图) 用纯化重组人 LOXL2 的 Amplex Red 试验显示 LOXL2 的 87kD 和 55kD 形式都具有活性且被 BAPN 抑制 (混合物 = 2 种形式的 $\sim 50 : 50$ 混合物)。(d 小图) BAPN 抑制纯化重组人 LOXL2 的剂量反应曲线 (Amplex Red 试验; 数据根据对照标准化)。(e-g 小图) 用非靶向 siRNA (siNT) 或 LOXL2 siRNA 转染 HS578t 且随后对 LOXL2 或 I 型胶原的表达染色。LOXL2 表达与 I 型胶原共定位 (siNT 的 LOXL2 染色 (e 小图), LOXL2 siRNA 的 LOXL2 染色 (f 小图) 和 I 型胶原 (g 小图))。(h 小图) MC3T3E1 中的 LOX 分泌 (CM 浓缩 $\sim 20X$)。(i, j 小图) 常氧 (i 小图) 或缺氧 (j 小图) 条件下肿瘤或成纤维细胞系的 LOX 表达显示无可测的 LOX 分泌不可检测 (CM 浓缩 $\sim 20X$)。(k, l 小图) 用非靶向 shRNA (k 小图) 转染并用罗丹明鬼笔环肽染色的 MDA-MB-231 细胞保持其间质表型, 而用 LOXL2 shRNA (l 小图) 转染的细胞显现更上皮化的表型。(m, n 小图) 蛋白质印迹分析和 ELISA (n 小图) 都

显示 AB0023 特异于 LOXL2。(o 小图)AB0023 抑制 LOXL2 酶活性的剂量反应曲线(Amplex Red 试验)。(p 小图)AB0023 与小鼠 LOXL2 交叉反应。(q-t 小图)SW620 细胞的生长培养基补充有以下条件培养基:MDA-MB-231CM(r 小图)或转染有空载体(q 小图)、LOXL2(s 小图)或 LOXL2Y689F(t 小图)的 HEK293CM。所述细胞用罗丹明鬼笔环肽染色。

[0117] 图 9 的 a-b 小图显示不同张力下 HFF 细胞的 LOXL2 表达并确认了 LOXL2 敲减。(a 小图)HFF 细胞生长在细胞培养板(塑料)或者含 2mg/ml (2) 或 3mg/ml (3) I 型胶原的 I 型胶原凝胶上。所述凝胶脱离(漂浮)或锚定于培养皿(附着)。通过 Western 技术分析所述条件培养基并探测 LOXL2 表达。(b 小图)用非靶向 siRNA(siNT) 或 LOXL2siRNA(siLOXL2) 转染 HFF 细胞并经蛋白质印迹分析探测条件培养基的 LOXL2 表达。

[0118] 图 10 的 a-b 小图显示体内基质胶栓中浸润细胞的 LOXL2 表达(a、b 小图)。对基质胶栓中内皮细胞浸润的 IHC 分析确认了 LOXL2 表达(a 小图)。所述切片还用 CD31 染色(b 小图)以确认内皮细胞的存在。

[0119] 图 11 的 a-o 小图显示 AB0023 在原发性肿瘤和癌的转移性异种移植模型中的体内功效。(a 小图)MDA-MB-231 细胞的 qRT-PCR 分析证实所有 LOX/L 蛋白的转录(RPL-19 用作参比)。(b-e 小图)从载剂(b 小图)、抗 LOXL2 抗体 AB0023(c 小图)、抗 LOX 抗体 M64(d 小图)或多西他赛(e 小图)处理小鼠中收获的 MDA-MB-435 已建立原发性肿瘤的 CD31 染色显示 AB0023 处理中 CD31 染色比载剂处理降低 74% ($p = 0.0002$)。(f、g 小图)就 VEGF(f 小图)和 LOXL2(g 小图)表达染色的人乳腺癌显示 TAF 表达的相似性。(h-o 小图)来自载剂和 AB0023 处理小鼠的 MDA-MB-435 已建立原发性肿瘤就 LOXL2(h 小图,载剂处理;i 小图,AB0023 处理)、VEGF(j 小图,载剂;k 小图,AB0023) 和 SDF-1(l 小图,载剂;m 小图,AB0023) 的表达进行染色以及用 H&E(n 小图,载剂;o 小图 AB0023) 染色。

[0120] 图 12 的 a-d 小图显示 CC14 诱发纤维化模型中鼠肝内的纤维发生。(a-d 小图)鼠 CC14 诱发肝纤维化模型显示肝损伤和纤维化的早期迹象,由早死动物(第 11 天)的肝(a 小图)相比健康肝(b 小图)的 I 型胶原染色证实(天狼星红)。用于桥接纤维化分析的肝示例中:AB0023 处理小鼠(d 小图)的桥接纤维化完全性显著低于载剂处理(c 小图)($p = 0.002$)。

[0121] 发明详述

[0122] 除非另有说明,本文的实施采用细胞生物学、毒理学、分子生物学、生物化学、细胞培养、免疫学、肿瘤学、重组 DNA 领域和相关领域中的标准方法和常规技术,所述方法和技术在本领域技术范围内。这些技术描述于文献中并因而本领域技术人员可用。参见例如 Alberts, B. 等“Molecular Biology of the Cell(《细胞分子生物学》)”,第 5 版,纽约州纽约市的加兰德科学出版社(arland Science)008;Voet, D. 等“Fundamentals of Biochemistry:Life at the Molecular Level(基础生物化学:分子水平的生命)”第 3 版,新泽西州霍博肯的约翰威利出版社(John Wiley & Sons),2008;Sambrook, J. 等,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual(《分子克隆:实验室手册》)”第 3 版,冷泉港实验出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),2001;Ausubel, F. 等“Current Protocols in Molecular Biology(《新编分子生物学实验指南》)”纽约的约翰威利出版社,1987,定期更新;Freshney, R. I.,“Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique(《动物细胞培养:基本技术手册》)”第 4 版,新泽西州萨默塞特的约翰威利出版

社,2000;“Methods in Enzymology(《酶学方法》)”丛书,加利福尼亚州圣地亚哥的学术出版社(Academic Press)。

[0123] 本发明人鉴定了基质酶赖氨酰氧化酶样 2(LOXL2) 在产生肿瘤和纤维化疾病的病理微环境中的作用。人肿瘤和肝纤维化的分析显示激活的成纤维细胞和新生血管有广泛且保守的 LOXL2 表达。用抗 LOXL2 单克隆抗体抑制 LOXL2 在癌的原发性和转移性异种移植模型以及 CCl₄ 诱导的肝纤维化中都有效。LOXL2 抑制不仅引起成纤维细胞激活、成纤维细胞募集、结缔组织形成和血管形成的大幅减少,还导致促血管生成生长因子和细胞因子如 VEGF 和 SDF1 生成显著降低。抑制赖氨酰氧化酶(LOXL) 若有此类影响,也很微小。

[0124] 已采用小分子 β -氨基丙腈(BAPN) 研究体外和体内抑制 LOX/L 活性的影响。BAPN 共价修饰酶结构域中的赖氨酸-酪氨酸酯并因而起不可逆抑制剂的作用。BAPN 缺乏特异性,因为它不仅抑制不同 LOX/L 的潜在各种活性,还抑制其它胺氧化酶的类似结构域。所述抗 LOXL2 抗体优于小分子泛赖氨酰氧化酶抑制剂 β -氨基丙腈(BAPN)。所述抗 LOXL2 抗体起特异性 LOXL2 抑制剂的作用,代表在肿瘤和纤维化疾病中有广泛应用性的新治疗方法。

[0125] 本发明人揭示了 LOXL2 在确立肿瘤和纤维化疾病的病理微环境中的作用,证明 LOXL2 是治疗的靶标。TAF 和肿瘤脉管系统的 LOXL2 蛋白表达和分泌在实体肿瘤中普遍存在,在肿瘤-间质界面尤其明显。LOXL2 也在结缔组织形成和血管球微血管增生区域中显著表达,这两者都与多种癌症预后差相关联。在活性肝纤维化中,LOXL2 在肝细胞-肌成纤维细胞界面和相关新生血管处的表达类似。

[0126] 本发明人进一步确定了 LOXL2 表达导致多种细胞类型中的肌动蛋白细胞骨架重构,所述细胞类型包括上皮来源的肿瘤细胞、内皮细胞和成纤维细胞。LOXL2 对疾病进展的一个作用是激活和募集疾病相关成纤维细胞,最可能是通过其酶催化纤维胶原交联和局部基质张力的相应变化。在肿瘤和肝纤维化中,张力增加可导致疾病相关的细胞分化。生成纤维胶原和产生组织内张力后,TAF(可能还有肌成纤维细胞)分泌许多血管生成性、血管发生性和趋化性的生长因子以及细胞因子支持肿瘤发生和纤维化的发展。

[0127] 本文公开了癌和纤维化模型中对分泌 LOXL2 活性的特异性抑制导致由多种参数评价的疾病显著减轻。抑制 LOXL2 能直接影响血管生成以及疾病相关上皮的侵袭和分化。然而,单独抑制血管生成不能完全引起 LOXL2 抑制后观察到的效果,因为针对 VEGFR 和 PlGF 途径的有效抗血管生成并不如同 LOXL2 的抑制那样影响肿瘤中的 SMA 阳性细胞数量。

[0128] 本文还公开了体内 LOXL2 抑制导致成纤维细胞激活和募集的抑制,其结果包括结缔组织形成和促血管生成生长因子及细胞因子的表达显著降低,肿瘤脉管系统形成缺失,肿瘤细胞坏死和自噬增加。LOXL2 抑制也大幅减少作为纤维化标记的纤维胶原生成,这并非由于胶原表达的直接调节而是由于活化肌成纤维细胞(引起大部分胶原生成的细胞类型)数量显著减少,。

[0129] 提出了许多疾病相关活化成纤维细胞的可能来源,包括纤维细胞和其它骨髓衍生细胞、常驻成纤维细胞(resident fibroblast)或其它前体、上皮细胞的上皮-间质转换(EMT)。在本文公开的内容中,在涉及不同疾病位点的 3 种很不同的小鼠模型中获得治疗性益处,在 2 种适于进一步分析的模型中所述机制看来保守,其中成纤维细胞激活显著减少。这些结果提示 LOXL2 对于成纤维细胞最终分化和激活是重要的,且不依赖于其来源。

[0130] 本发明人在本文中揭示单独 LOXL2 抑制足以获得治疗性功效,尽管使用的模型系

统所含细胞产生包括 LOX 在内的多种赖氨酰氧化酶型酶。作为比对,使用特定 LOX 特异性单克隆抗体在肿瘤和纤维化模型中提供很少的治疗益处,所述抗体靶向的肽先前被鉴定为产生能抑制 LOX 酶活性的多克隆抗血清。

[0131] LOXL2 在患病与健康组织中的差异表达提供了一个功能性治疗窗口。为了支持抗 LOXL2 抗体 AB0023 的安全性,本发明人发现 AB0023 每周 2 次 50mg/kg 持续 14 周的剂量在小鼠中耐受良好,对重量或行为没有影响且在剖检、血液学、临床化学和组织病理学分析时未见药物相关观察。采用人源化抗 LOXL2 变体 (AB0024) 在猕猴中的前期研究进一步支持了抗 LOXL2 抗体治疗在 100mg/kg 重复剂量时耐受良好。

[0132] 抗体治疗提供了高度特异性抑制机制的一种示例。事实上,在基于细胞的实验和体内,用抑制其酶活性的抗体 (AB0023) 特异性靶向分泌的 LOXL2 优于特异性较低的细胞穿透性泛抑制剂 BAPN。(应注意,与以前的报道相反,发现 LOXL2 在体外易为 BAPN 抑制,具有低纳摩尔 IC₅₀,与 LOX 观察到的类似;图 8 的 D 小图和 Rodriguez 等, (2010) J. Biol. Chem. 285 :20964-20974。)除了特异性,此治疗模式提供额外的优点:作为 LOXL2 的非竞争性别构抑制剂,AB0023 和 AB0024 独立于底物浓度或 LOXL2 与其底物间的结合而起作用,而不可逆抑制剂 BAPN 作为竞争性抑制剂且在高底物浓度或 LOXL2 与其底物结合的条件下不太有效。在活动性疾病中,抑制的这种替代机制是对基质酶有广泛应用性的新型治疗方法,所述酶在含局部高浓度底物如纤维胶原的动态复合细胞环境中发挥作用。

[0133] 如本文所述,LOXL2 的别构抑制是一种抑制纤维化疾病和肿瘤的生长和进展的新方法,这是通过靶向疾病进展的基本共有特征,如产生间质室或基质微环境或转移性生境。即抑制单一靶标 (LOXL2) 对结缔组织形成的多种不同推动剂有多重效果。靶向 LOXL2 可通过使用单克隆抗体而具有高度特异性。此外,靶向肿瘤微环境中遗传上更稳定的间质细胞能降低抗药性的可能性。

[0134] 定义

[0135] “肿瘤环境”指肿瘤和其周边组织。肿瘤环境的某子集是肿瘤-间质界面,即肿瘤周边(例如肿瘤囊)与毗邻间质组织。另一子集是肿瘤本身;而另一子集是肿瘤外的间质组织。

[0136] “成纤维细胞激活”指正常成纤维细胞响应肿瘤细胞释放的信号(例如生长因子、细胞因子)转变成肿瘤相关成纤维细胞 (TAF) 的过程。这种生长因子的一种示例是转化生长因子- β (TGF- β)。成纤维细胞激活的示例性结果是活化的成纤维细胞中 α 平滑肌肌动蛋白 (aSMA) 的表达增加和血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达增加。

[0137] “肿瘤相关成纤维细胞 (TAF)”是已经历成纤维细胞激活的成纤维细胞,以 α 平滑肌肌动蛋白 (aSMA) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达增加等为特征。

[0138] “肌成纤维细胞”是兼具成纤维细胞和平滑肌细胞特征的细胞。它们存在于纤维组织,特征为表达 α 平滑肌肌动蛋白等。

[0139] “结缔组织形成”指纤维或结缔组织的生长。一些肿瘤引发结缔组织形成反应,即致密纤维组织在肿瘤周边弥散性生长。

[0140] “血管生成 (angiogenesis)”指从已存在的血管中形成新血管。

[0141] “血管发生 (vasculogenesis)”指在不存在已有血管的情况下形成新血管。

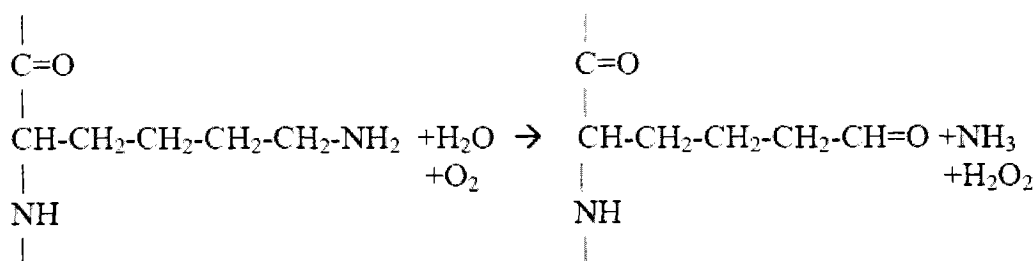
[0142] 肿瘤间质

[0143] 肿瘤的生长和发展取决于肿瘤和其周边间质组织间的相互作用。肿瘤在含结缔组织、成纤维细胞、肌成纤维细胞、白血球、内皮细胞、周细胞和平滑肌细胞的间质框架内生长。生长的肿瘤通过分泌生长因子（影响周围间质细胞行为）和分泌蛋白酶（重构间质胞外基质 (stromal extracellular matrix)）来影响周边间质。间质细胞进而分泌刺激所述肿瘤细胞生长和分裂的生长因子；并分泌进一步修饰基质的蛋白酶。肿瘤和其周边间质组织以此方式形成支持肿瘤进一步生长的肿瘤环境。例如，研究显示某些癌取决于肿瘤相关成纤维细胞的存在以持续生长，且在正常成纤维细胞存在时不以可检测或可观水平生长。还显示某些肿瘤的强生长需要通常由肥大细胞分泌的特定基质金属蛋白酶，其通过从胞外基质释放血管生成因子而起作用。

[0144] 赖氨酰氧化酶型酶

[0145] 本文所用的术语“赖氨酰氧化酶型酶”和“LOX/L”指催化赖氨酸和羟赖氨酸残基的 ϵ -氨基氧化脱氨的蛋白家族成员，该氧化脱氨导致肽基赖氨酸转变成肽基- α -氨基己二酸- δ -半醛（醛赖氨酸）并释放化学计量的氨和过氧化氢：

[0146]



肽基赖氨酸

肽基醛赖氨酸

[0147] 此反应最常胞外发生于胶原和弹性蛋白中的赖氨酸残基上。醛赖氨酸的醛基具有反应性且能与其它醛赖氨酸和赖氨酸残基自发缩合，导致胶原分子交联以形成胶原纤维。

[0148] 已从鸡、大鼠、小鼠、牛和人中纯化赖氨酰氧化酶型酶。所有赖氨酰氧化酶型酶包含长约 205 个氨基酸的共有催化结构域，其位于所述蛋白羧基末端部分且含有该酶的活性位点。所述活性位点包括含保守氨基酸序列的铜结合位点，所述序列含配位 Cu(II) 原子的 4 个组氨酸残基。所述活性位点还包含赖氨酰酪氨酰酮 (LTQ) 辅因子，由赖氨酸和酪氨酸残基（对应于大鼠赖氨酰氧化酶的 lys314 和 tyr349，以及人赖氨酰氧化酶的 lys320 和 tyr355）之间的分子内共价连接形成。形成 LTQ 辅因子的酪氨酸残基周边序列也在赖氨酰氧化酶型酶中保守。所述催化结构域还包含 10 个保守性半胱氨酸残基，他们参与 5 个二硫键的形成。所述催化结构域还包括纤连蛋白结合结构域。最后，所述催化结构域中存在含有 4 个半胱氨酸残基的类似生长因子和细胞因子受体结构域的氨基酸序列。尽管存在这些保守区，不同赖氨酰氧化酶型酶可在催化结构域内和之外通过核苷酸和氨基酸序列不同的区域来彼此区分。

[0149] 此酶家族中分离和表征的第一个成员是赖氨酰氧化酶 (EC 1.4.3.13)；也称为蛋白-赖氨酸 6-氧化酶、蛋白-L-赖氨酸：氧 6-氧化还原酶（脱氨基）或 LOX。参见例如 Harris 等, Biochim. Biophys. Acta 341:332-344(1974)；Rayton 等, J. Biol. Chem. 254:621-626(1979)；Stassen, Biophys. Acta 438:49-60(1976)。

[0150] 随后发现了其它赖氨酰氧化酶型酶。这些蛋白称为“LOX 样”或“LOXL”。它们都包含上述共有催化结构域并具有类似酶活性。目前,已知人和小鼠中都存在 5 种不同赖氨酰氧化酶型酶:LOX 和 4 种 LOX 相关或 LOX 样蛋白 LOXL1(也标注为“赖氨酰氧化酶样”、“LOXL”或“LOL”)、LOXL2(也标注为“LOR-1”)、LOXL3(也标注为“LOR-2”)和 LOXL4。编码所述 5 种不同赖氨酰氧化酶型酶的基因各位于不同染色体。参见例如 Molnar 等, *Biochim Biophys Acta*. 1647 :220-24(2003); Csiszar, *Prog. Nucl. Acid Res.* 70 :1-32(2001); 2001 年 11 月 8 日发表的 WO 01/83702 和美国专利第 6,300,092 号,其都通过引用纳入本文。已从鼠 EC 细胞系中分离出名为 LOXC 的 LOX 样蛋白,其与 LOXL4 具有一些相似性但表达模式不同。Ito 等 (2001) *J. Biol. Chem.* 276 :24023-24029。从果蝇 (*Drosophila*) 中分离了 2 种赖氨酰氧化酶型酶 DmLOXL-1 和 DmLOXL-2。

[0151] 尽管所有赖氨酰氧化酶型酶共有共同的催化结构域,但它们也彼此不同,具体是在其氨基末端区。所述 4 种 LOXL 蛋白相较 LOX 具有氨基末端延伸。因此,人前 LOX 原(preproLOX)(即信号序列切割前的初级翻译产物,见下)包含 417 个氨基酸残基;LOXL1 包含 574 个,LOXL2 包含 638 个,LOXL3 包含 753 个而 LOXL4 包含 756 个。

[0152] LOXL2、LOXL3 和 LOXL4 在其氨基末端区含有 4 个重复的清除受体富半胱氨酸(SRCR)结构域。这些结构域在 LOX 或 LOXL1 中不存在。在分泌、跨膜或胞外基质蛋白中发现 SRCR 结构域,已知该结构域在许多分泌和受体蛋白中介导配体结合。Hoheneste 等 (1999) *Nat. Struct. Biol.* 6 :228-232; Sasaki 等 (1998) *EMBO J.* 17 :1606-1613。LOXL3 在 SRCR 结构域外还包含氨基末端区的核定位信号。富脯氨酸结构域看来是 LOXL 1 特有的。Molnar 等 (2003) *Biochim. Biophys. Acta* 1647 :220-224。各种赖氨酰氧化酶型酶的糖基化模式也不同。

[0153] 所述赖氨酰氧化酶型酶的组织分布也不同。人 LOX mRNA 在心脏、胎盘、睾丸、肺、肾和子宫中高表达,但在脑和肝中微弱表达。人 LOX1mRNA 在胎盘、肾、肌肉、心脏、肺和胰腺中表达,且与 LOX 类似,在脑和肝中表达水平低许多。Kim 等 (1995) *J. Biol. Chem.* 270 :7176-7182。高水平的 LOXL2 mRNA 在子宫、胎盘和其它器官中表达,但如 LOX 和 LOXL1,其在脑和肝中低水平表达。Jourdan Le-Saux 等 (1999) *J. Biol. Chem.* 274 :12939 :12944。LOXL3mRNA 在睾丸、脾和前列腺中高表达,在胎盘中中等表达,在肝中不表达,而在肝中观察到高水平的 LOXL4mRNA。Huang 等 (2001) *Matrix Biol.* 20 :153-157; Maki 和 Kivirikko (2001) *Biochem. J.* 355 :381-387; Jourdan Le-Saux 等 (2001) *Genomics* 74 :211-218; Asuncion 等 (2001) *Matrix Biol.* 20 :487-491。

[0154] 不同赖氨酰氧化酶型酶在疾病中的表达和/或参与也改变。参见例如 Kagen (1994) *Pathol. Res. Pract.* 190 :910-919; Murawaki 等 (1991) *Hepatology* 14 :1167-1173; Siegel 等 (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 :2945-2949; Jourdan Le-Saux 等 (1994) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 199 :587-592; Kim 等 (1999) *J. Cell Biochem.* 72 :181-188。赖氨酰氧化酶型酶还与许多癌症有关,包括头颈癌、膀胱癌、结肠癌、食管癌和乳腺癌。参见例如 Wu 等 (2007) *Cancer Res.* 67 :4123-4129; Gorrough 等 (2007) *J. Pathol.* 212 :74-82; Csiszar (2001) *Prog. Nucl. Acid Res.* 70 :1-32 和 Kirschmann 等 (2002) *Cancer Res.* 62 :4478-4483。

[0155] 因此,尽管所述赖氨酰氧化酶型酶在结构和功能上呈现某些重叠,它们各具有独

特的结构以及功能。例如,就结构而言,针对人 LOX 蛋白催化结构域产生的某些抗体不结合人 LOXL2。就功能而言,据报道小鼠中靶向缺失 LOX 看来对分娩致命,而 LOXL1 缺陷不引起严重的发育表型。Hornstra 等 (2003) *J. Biol. Chem.* 278 :14387-14393 ;Bronson 等 (2005) *Neurosci. Lett.* 390 :118-122。

[0156] 尽管最广泛记载的赖氨酰氧化酶型酶活性是氧化细胞外胶原和弹性蛋白中的特定赖氨酸残基,但有证据显示赖氨酰氧化酶型酶还参与许多胞内过程。例如,据报道某些赖氨酰氧化酶型酶调节基因表达。Li 等 (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 :12817-12822 ; Giampuzzi 等 (2000) *J. Biol. Chem.* 275 :36341-36349。此外,据报道 LOX 氧化组蛋白 H1 中的赖氨酸残基。LOX 的其它胞外活性包括诱导单核细胞、成纤维细胞和平滑肌细胞趋化性。Lazarus 等 (1995) *Matrix Biol.* 14 :727-731 ;Nelson 等 (1988) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 188 :346-352。LOX 自身表达受许多生长因子和类固醇如 TGF- β 、TNF- α 和干扰素诱导。Csiszar (2001) *Prog. Nucl. Acid Res.* 70 :1-32。近期研究显示 LOX 在多种生物学功能如发育调节、肿瘤抑制、细胞迁移和细胞衰老中具有其它作用。

[0157] 来自各种来源的赖氨酰氧化酶 (LOX) 蛋白的示例包括具有的氨基酸序列与以下序列之一所表达或翻译的多肽基本相同的酶:EMBL/GenBank 登录号:M94054 ; AAA59525.1-mRNA ;S45875 ;AAB23549.1-mRNA ;S78694 ;AAB21243.1-mRNA ;AF039291 ; AAD02130.1-mRNA ;BC074820 ;AAH74820.1-mRNA ;BC074872 ;AAH74872.1-mRNA ;M84150 ; AAA59541.1-基因组 DNA。LOX 的一个实施方式是人赖氨酰氧化酶 (hLOX) 前蛋白原。

[0158] 赖氨酰氧化酶样酶编码序列的示例性公开如下:LOXL1 由以 GenBank/EMBL BC015090 保藏的 mRNA 编码、AAH15090.1 ;LOXL2 由以 GenBank/EMBL U89942 保藏的 mRNA 编码;LOXL3 由以 GenBank/EMBL AF282619 保藏的 mRNA 编码、AAK51671.1 ;LOXL4 由以 GenBank/EMBL AF338441 保藏的 mRNA 编码、AAK71934.1。

[0159] 称为前肽原的 LOX 蛋白初级翻译产物包含从氨基酸 1-21 延伸的信号序列。此信号序列在小鼠和人 LOX 中都通过 Cys21 与 Ala22 间的切割来胞内释放,从而产生 LOX 的 46-48kDa 前肽形式,在本文中也称为全长形式。所述前肽在通过高尔基体时进行 N-糖基化以产生 50kDa 蛋白,然后分泌到胞外环境中。在此阶段,所述蛋白没有催化活性。在小鼠 LOX 的 Gly168 和 Asp169 之间、人 LOX 的 Gly174 和 Asp175 之间的进一步切割产生成熟、具催化活性的 30-32kDa 酶,释放 18kDa 前肽。此最终切割事件由金属内切蛋白酶前胶原 C 蛋白酶催化,该酶也称为骨形态发生蛋白-1 (BMP-1)。有趣的是,该酶还在 LOX 底物—胶原的加工中发挥作用。此后去除 N-糖基单元。

[0160] 预测在可能的信号肽切割位点在 LOXL1、LOXL2、LOXL3 和 LOXL4 的氨基末端。所预测信号切割位点为:LOXL1 在 Gly25 和 Gln26 之间,LOXL2 在 Ala25 和 Gln26 之间,LOXL3 在 Gly25 和 Ser26 之间,LOXL4 在 Arg23 和 Pro24 之间。

[0161] 已鉴定 LOXL1 蛋白的 BMP-1 切割位点在 Ser354 和 Asp355 之间。Borel 等 (2001) *J. Biol. Chem.* 276 :48944-48949。已预测其它赖氨酰氧化酶型酶的潜在 BMP-1 切割位点,预测是根据前胶原和前 LOX 中 BMP-1 切割的共有序列位于 Ala/Gly-Asp 序列,该序列后常有酸性或带电残基。LOXL3 中预测的 BMP-1 切割位点位于 Gly447 和 Asp448 之间;加工此位点可产生与成熟 LOX 大小类似的成熟肽。也在 LOXL4 内鉴定了潜在的 BMP-1 切割位点,位于残基 Ala569 和 Asp570 之间。Kim 等 (2003) *J. Biol. Chem.* 278 :52071-52074。LOXL2 也可

与其它 LOXL 家族成员类似地进行蛋白水解切割并分泌。Akiri 等 (2003) *Cancer Res.* 63 : 1657-1666。

[0162] 如赖氨酰氧化酶型酶中存在共有催化结构域所预期,存在活性位点的所述酶原 C 末端 30kDa 区的序列高度保守 (约 95%)。在所述酶原结构域中观察到较为中等的保守性 (约 60-70%)。

[0163] 就本公开的目的而言,术语“赖氨酰氧化酶型酶”包括所有上述 5 种赖氨酸氧化酶 (LOX、LOXL1、LOXL2、LOXL3 和 LOXL4),也包括基本保留酶活性如催化赖氨酰残基的能力的 LOX、LOXL1、LOXL2、LOXL3 和 LOXL4 的功能片段和 / 或衍生物。通常,功能片段和 / 或衍生物保留其至少 50% 的赖氨酸氧化活性。在一些实施方式中,功能片段和 / 或衍生物保留其至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 或 100% 的赖氨酸氧化活性。

[0164] 赖氨酰氧化酶型酶的功能片段还旨在包括不显著改变催化活性的保守性氨基酸取代 (就天然多肽序列而言)。术语“保守性氨基酸取代”指基于某些共有结构和 / 或性质的氨基酸分组。就共有结构而言,氨基酸可分成含非极性侧链 (甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸和色氨酸),含极性非带电侧链 (丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸和半胱氨酸) 和含极性带电侧链 (赖氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和组氨酸)。含芳族侧链的氨基酸组包括苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。脯氨酸、色氨酸和组氨酸中存在杂环侧链。在含非极性侧链的氨基酸组中,具有短烃侧链的氨基酸 (甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸) 可与具有较长、非烃侧链的氨基酸 (甲硫氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸和色氨酸) 相区分。在具有极性带电侧链的氨基酸中,酸性氨基酸 (天冬氨酸、谷氨酸) 可与带碱性侧链的氨基酸 (赖氨酸、精氨酸和组氨酸) 相区分。

[0165] 一种确定个体氨基酸共有性质的功能法是分析同源生物体对应蛋白之间氨基酸改变的归一化频率 (Schulz, G.E. 和 R.H. Schirmer, *Principles of Protein Structure* (《蛋白结构原理》),施普林格出版公司 (Springer-Verlag), 1979)。根据此类分析,可限定氨基酸组,同源蛋白中优选组内的氨基酸相互取代,从而对总体的蛋白结构具有相似的影响 (Schulz, G.E. 和 R.H. Schirmer, 《蛋白结构原理》,施普林格出版公司, 1979)。根据此类分析,可确定彼此保守性取代的以下氨基酸组:

[0166] (i) 含带电基团的氨基酸,由 Glu、Asp、Lys、Arg 和 His 组成,

[0167] (ii) 含带正电基团的氨基酸,由 Lys、Arg 和 His 组成,

[0168] (iii) 含带负电基团的氨基酸,由 Glu 和 Asp 组成,

[0169] (iv) 含芳族基团的氨基酸,由 Phe、Tyr 和 Trp 组成,

[0170] (v) 含氮环基团的氨基酸,由 His 和 Trp 组成,

[0171] (vi) 含大的脂肪族非极性基团的氨基酸,由 Val、Leu 和 Ile 组成,

[0172] (vii) 含微极性基团的氨基酸,由 Met 和 Cys 组成,

[0173] (viii) 含小残基的氨基酸,由 Ser、Thr、Asp、Asn、Gly、Ala、Glu、Gln 和 Pro 组成,

[0174] (ix) 含脂肪族基团的氨基酸,由 Val、Leu、Ile、Met 和 Cys 组成,以及

[0175] (x) 含羟基的氨基酸,由 Ser 和 Thr 组成。

[0176] 因此,如上所示范,氨基酸的保守性取代为本领域技术人员已知且可常规进行而不改变所得分子的生物学活性。本领域技术人员还认识到,多肽非必需区域的单一氨基

酸取代通常不显著改变生物学活性。参见例如 Watson 等,“Molecular Biology of the Gene(《基因分子生物学》)”第 4 版,1987,加利福尼亚州门洛帕克的本杰明 / 卡明斯出版公司(The Benjamin/Cummings Pub.Co.),第 224 页。

[0177] 其它关于赖氨酰氧化酶型酶的信息,参见例如 Rucker 等 (1998)Am. J. Clin. Nutr. 67 :996S-1002S 和 Kagan 等 (2003)J. Cell. Biochem 88 :660-672。还参见共有的美国专利申请公开号 2009/0053224(2009 年 2 月 26 日提交)和 2009/0104201(2009 年 4 月 23 日提交),所述公开通过引用纳入本文。

[0178] 赖氨酰氧化酶型酶活性的调节剂

[0179] 赖氨酰氧化酶型酶活性的调节剂包括激活剂(激动剂)和抑制剂(拮抗剂),可用多种筛选实验选择。在一种实施方式中,可通过确定测试化合物是否结合赖氨酰氧化酶型酶来鉴定调节剂;其中如果发生结合,所述化合物是候选调节剂。任选地,可用这种候选调节剂完成其它试验。或者,可使候选化合物接触赖氨酰氧化酶型酶,分析该赖氨酰氧化酶型酶的生物学活性;改变所述赖氨酰氧化酶型酶生物学活性的化合物是赖氨酰氧化酶型酶的调节剂。通常,降低赖氨酰氧化酶型酶生物学活性的化合物是该酶的抑制剂。

[0180] 赖氨酰氧化酶型酶活性的调节剂的其它鉴定方法包括在含一种或多种赖氨酰氧化酶型酶的细胞培养物中孵育候选化合物并分析所述细胞的一种或多种生物学活性或特征。改变培养中细胞的生物学活性或特征的化合物是赖氨酰氧化酶型酶活性的潜在调节剂。例如,可分析的生物学活性包括赖氨酸氧化、过氧化物生成、氨生成、赖氨酰氧化酶型酶的水平、编码赖氨酰氧化酶型酶的 mRNA 水平和 / 或赖氨酰氧化酶型酶的一种或多种特异性功能。在上述实验的其它实施方式中,未接触所述候选化合物时,一种或多种生物学活性或细胞特征与一种或多种赖氨酰氧化酶型酶的水平或活性相关联。例如,所述生物学活性可以是细胞功能如迁移、趋化性、上皮-间质转化,所述变化通过与一种或多种对照或参比样品比对来检测。例如,阴性对照样品可包括加有候选化合物的赖氨酰氧化酶型酶水平降低的培养物;或赖氨酰氧化酶型酶含量与测试培养物相同但没有加入候选化合物的培养物。在一些实施方式中,含不同赖氨酰氧化酶型酶水平的单独培养物与候选化合物接触。如果观察到生物活性变化,且如果所述变化在赖氨酰氧化酶型酶水平较高的培养物中更大,则该化合物鉴定为赖氨酰氧化酶型酶的活性调节剂。确定化合物是赖氨酰氧化酶型酶的激活剂还是抑制剂,可从该化合物诱导的表型中显现,或可能需要进一步实验,例如测试该化合物对一种或多种赖氨酰氧化酶型酶的酶活性的影响。

[0181] 本领域已知获得赖氨酰氧化酶型酶的生化或重组方法,以及上述鉴定赖氨酰氧化酶型酶活性调节剂的细胞培养和酶实验方法。

[0182] 赖氨酰氧化酶型酶的酶活性可通过许多不同方法分析。例如,评价赖氨酰氧化酶活性可通过检测和 / 或定量过氧化氢、铵离子和 / 或醛的生成,通过分析赖氨酸氧化和 / 或胶原交联,或通过测量细胞侵袭力、细胞粘附、细胞生长或转移性生长。参见例如 Trackman 等 (1981)Anal. Biochem. 113 :336-342;Kagan 等 (1982)Meth. Enzymol. 82A :637-649;Palamakumbura 等 (2002)Anal. Biochem. 300 :245-251;Albini 等 (1987)Cancer Res. 47 :3239-3245;Kamath 等 (2001)Cancer Res. 61 :5933-5940;美国专利第 4,997,854 号和美国专利申请公开第 2004/0248871 号。

[0183] 例如,测试化合物包括但不限于:有机小分子(如分子量为约 50- 约 2,500Da 的

有机分子),核酸或蛋白。所述化合物或多种化合物可化学合成或微生物学法生成和/或包含于例如来自如植物、动物或微生物的样品如细胞提取物中。此外,所述化合物在本领域已知,但迄今未知能否调节赖氨酰氧化酶型酶的活性。分析赖氨酰氧化酶型酶调节剂的反应混合物可以是无细胞提取物或可包括细胞培养物或组织培养物。例如,多种化合物可以加入反应混合物、加入培养基、注入细胞或给予转基因动物。例如,所述试验中采用的细胞或组织可以是细菌细胞、真菌细胞、昆虫细胞、脊椎动物细胞、哺乳动物细胞、灵长类动物细胞、人细胞或者可包括或获自非人转基因动物。

[0184] 本领域技术人员已知用于产生和筛选大型文库的一些方法以鉴定对靶标如赖氨酰氧化酶型酶有特异亲和性的化合物。这些方法包括噬菌体展示法,其中从噬菌体展示随机肽并用固定受体通过亲和层析进行筛选。参见例如 WO 91/17271、WO 92/01047 和美国专利第 5,223,409 号。在另一方法中,用光刻法合成固定在固相载体(例如“芯片(chip)”)上的聚合物组合库。参见例如美国专利第 5,143,854 号、WO 90/15070 和 WO 92/10092。使固定的聚合物接触带标记受体(例如赖氨酰氧化酶型酶)并扫描载体以确定标记位置,从而鉴定结合所述受体的聚合物。

[0185] 已描述了在连续纤维素膜载体系统上合成和筛选肽库,其可用于鉴定感兴趣多肽(例如赖氨酰氧化酶型酶)的结合配体,参见例如 Kramer(1998)Methods Mol. Biol. 87:25-39。这类试验鉴定的配体是感兴趣蛋白的候选调节剂,可选择用于进一步测试。例如,此方法还可用于确定感兴趣蛋白中的结合位点和识别基序。参见例如 Rudiger(1997)EMBO J. 16:1501-1507 和 Weiergraber(1996)FEBS Lett. 379:122-126。

[0186] WO 98/25146 描述了筛选复合物库中具所需性质化合物的其它方法,所需性质如激活、结合、或拮抗多肽或其细胞受体的能力。这些库中的复合物包括测试化合物、记录该化合物合成中至少一步的标记、易为受体分子修饰的栓系(tether)。用系丝的修饰表明复合物含有具备所需性质的化合物。可解码标记来揭示这种化合物合成中的至少一步。鉴定与赖氨酰氧化酶型酶相互作用的化合物的其它方法是,例如,带噬菌体展示系统的体外筛选、滤膜结合试验、用例如 BIAcore 设备(法玛西亚公司(Pharmacia))“实时”测量相互作用。

[0187] 所有这些方法可根据本文使用以鉴定赖氨酰氧化酶型酶或相关多肽的激活剂/激动剂和抑制剂/拮抗剂。

[0188] 合成赖氨酰氧化酶型酶调节剂的另一方法是使用肽的模拟类似物。例如,可通过用立体异构体即 D-氨基酸取代天然产生的氨基酸来生成模拟肽类似物;参见例如 Tsukida(1997)J. Med. Chem. 40:3534-3541。此外,可将前模拟组分纳入肽以重建可能在移除部分原始多肽时丧失的构象性质。参见例如 Nachman(1995)Regul. Pept. 57:359-370。

[0189] 另一构建肽模拟物的方法是将非手性 α -氨基酸残基纳入肽,引起脂肪链的聚甲烯单元取代酰胺键。Banerjee(1996)Biopolymers 39:769-777。其它系统中小肽激素的超活性拟肽类似物已有描述。Zhang(1996)Biochem. Biophys. Res. Commun. 224:327-331。

[0190] 赖氨酰氧化酶型酶调节剂的肽模拟物还可通过经连续酰胺烷化合成肽模拟物组合库,然后测试所得化合物如测试其结合和免疫学性质来鉴定。产生和使用拟肽组合库的方法已有描述。参见例如 Ostresh(1996)Methods in Enzymology 267:220-234 和 Dorner(1996)Bioorg. Med. Chem. 4:709-715。此外,一种或多种赖氨酰氧化酶型酶的三维和

/ 或晶体结构可用于设计一种或多种赖氨酰氧化酶型酶活性的肽模拟抑制剂。Rose(1996) *Biochemistry* 35 :12933-12944 ;Rutenber(1996) *Bioorg. Med. Chem.* 4 :1545-1558。

[0191] 基于结构设计和合成模拟天然生物多肽活性的低分子量合成分子进一步描述于 例如 Dowd(1998) *Nature Biotechnol.* 16 :190-195 ;Kieber-Emmons(1997) *Current Opinion Biotechnol.* 8 :435-441 ;Moore(1997) *Proc. West Pharmacol. Soc.* 40 :115-119 ; Mathews(1997) *Proc. West Pharmacol. Soc.* 40 :121-125 ; 和 Mukhi ja(1998) *European J. Biochem.* 254 :433-438。

[0192] 本领域技术人员还熟知能设计、合成和评估有机小化合物的模拟物,例如,所述模拟物能用作赖氨酰氧化酶型酶的底物或配体。例如,已描述海帕洛素 (hapalosin) 的 D- 葡萄糖模拟物在拮抗细胞毒性中多重耐药性辅助相关蛋白 (multidrug resistance assistance-associated protein) 中呈现与海帕洛素类似的与海帕洛素类似的功效。Dinh(1998) *J. Med. Chem.* 41 :981-987。

[0193] 可研究赖氨酰氧化酶型酶结构以引导选择调节剂如小分子、肽、肽模拟物和抗体。赖氨酰氧化酶型酶的结构特性有助于鉴定结合赖氨酰氧化酶型酶或作为其配体、底物、结合伴侣或受体的天然或合成分子。参见例如 Engleman(1997) *J. Clin. Invest.* 99 :2284-2292。例如,可用合适计算机程序进行赖氨酰氧化酶型酶结构基序的折叠模拟和计算机重设计。Olszewski(1996) *Proteins* 25 :286-299 ;Hoffman(1995) *Comput. Appl. Biosci.* 11 :675-679。蛋白质折叠的计算机建模可用于详细肽和蛋白结构的构象和能量分析。Monge(1995) *J. Mol. Biol.* 247 :995-1012 ;Renouf(1995) *Adv. Exp. Med. Biol.* 376 :37-45。合适程序可用于鉴定赖氨酰氧化酶型酶中与配体和结合伴侣相互作用的位点,使用计算机辅助搜索互补肽序列。Fassina(1994) *Immunomethods* 5 :114-120。设计蛋白和肽的其它系统描述于如 Berry(1994) *Biochem. Soc. Trans.* 22 :1033-1036 ;Wodak(1987), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 501 :1-13 ;和 Pabo(1986) *Biochemistry* 25 :5987-5991。上述结构分析所得结果可用于例如制备作为一种或多种赖氨酰氧化酶型酶活性调节剂的有机分子、肽和肽模拟物。

[0194] 赖氨酰氧化酶型酶的抑制剂可以是竞争性抑制剂、无竞争性抑制剂、混合抑制剂或非竞争性抑制剂。竞争性抑制剂通常具有与底物的结构类似性,常结合活性位点,在底物浓度较低时更有效。存在竞争性抑制剂时表观 K_M 提高。无竞争性抑制剂一般结合酶-底物复合物或结合在底物结合活性位点后变得可用的位点,且可使活性位点变形。存在无竞争性抑制剂时表观 K_M 和 V_{max} 都降低,底物浓度对抑制影响很小或没有。混合抑制剂能结合游离酶和酶-底物复合物并因而影响底物结合和催化活性。非竞争性抑制是混合抑制的特殊情况,其中所述抑制剂以相等亲和力结合酶和酶-底物复合物,且抑制不受底物浓度影响。非竞争性抑制剂一般在活性位点之外区域结合酶。关于酶抑制的其它详情参见例如 Voet 等 (2008), 同上。有些酶如赖氨酰氧化酶型酶的酶,其天然底物 (例如胶原、弹性蛋白) 通常在体内以极大过量 (与体内能获得的任何抑制剂的浓度相比) 存在,非竞争性抑制剂对于这些酶具有优势,因为抑制独立于底物浓度。

[0195] 抗体

[0196] 在某些实施方式中,赖氨酰氧化酶型酶的调节剂是抗体。在其它实施方式中,抗体是赖氨酰氧化酶型酶活性的抑制剂。

[0197] 本文所用的术语“抗体”指含有的肽序列（例如可变区序列）特异性结合抗原表位的分离或重组多肽结合剂。所述术语以广义使用，特别涵盖单克隆抗体（包括全长单克隆抗体）、多克隆抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、纳米抗体、双抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体），以及包括但不限于 Fv、scFv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fab₂ 的抗体片段，只要它们表现出所需生物学活性。术语“人抗体”指含人来源序列的抗体，除了可能的非人 CDR 区以外，并且不意味着存在免疫球蛋白分子的完整结构，只要所述抗体在人体中具有最小的免疫原性效果（即不诱导临床显著生成其自身抗体）。

[0198] “抗体片段”包括全长抗体的部分，例如全长抗体的抗原结合或可变区。抗体片段的示例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段；双抗体；线性抗体（Zapata 等（1995）Protein Eng. 8(10):1057-1062）；单链抗体分子；和由抗体片段形成的多特异性抗体。木瓜蛋白酶消化抗体产生称为“Fab”片段的各具有单个抗原结合位点的 2 种相同抗原结合片段以及剩余“Fc”片段，Fc 的命名反映了易结晶的能力。胃蛋白酶处理产生具有 2 种抗原组合位点且仍能交联抗原的 F(ab')₂ 片段。

[0199] “Fv”是含有完整抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。此区域由一条重链和一条轻链可变区的紧密、非共价结合的二聚体组成。此构型中各可变区的所有 3 种 CDRs 相互作用以在 V_H-V_L 二聚体表面确定抗原结合位点。所述 6 种 CDR 共同赋予抗体抗原结合特异性。然而，单个可变区（或仅含 6 种抗原特异性 CDR 其中 3 种的分离 V_H 或 V_L 区）仍能识别和结合抗原，尽管亲和力一般低于完整 Fv 片段。

[0200] 在重链和轻链可变区外，“Fab”片段还含有轻链恒定区和重链第一恒定区（CH₁）。最初在木瓜蛋白酶消化抗体后观察到 Fab 片段。Fab' 片段与 Fab 片段的差异在于 F(ab')₂ 片段在重链 CH₁ 结构域羧基末端含有一些其它残基，包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。F(ab')₂ 片段含有通过二硫键在铰链区附近连接的 2 个 Fab 片段，其最初在胃蛋白酶消化抗体后观察到。Fab'-SH 是本文中对 Fab' 片段的标识，其中恒定区的半胱氨酸残基携带游离巯基。抗体片段的其它化学偶联也已知。

[0201] 任何脊椎动物种抗体（免疫球蛋白）的“轻链”可根据其恒定区氨基酸序列分入称为 κ 和 λ 的 2 种显著不同类型中的一种。根据重链恒定区的氨基酸序列，免疫球蛋白可分成 5 个主要类别：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，其中几种可进一步分成亚类（同种型），例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。

[0202] “单链 Fv”或“sFv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 V_H 和 V_L 结构域，其中这些结构域存在于单一多肽链中。在一些实施方式中，所述 Fv 多肽还包括 V_H 和 V_L 结构域间的多肽接头，使所述 sFv 能形成抗原结合所需的结构。关于 sFv 的综述参见 Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies（《单克隆抗体药理学》），第 113 卷（Rosenburg 和 Moore 编），纽约的施普林格出版公司，第 269-315 页（1994）。

[0203] 术语“双抗体”指具有 2 个抗原结合位点的小抗体片段，所述片段包括在同一多肽链（V_H-V_L）中接有轻链可变区（V_L）的重链可变区（V_H）。通过使用短到使同一链的 2 个结构域间不能配对的接头，迫使所述结构域与另一链的互补结构域配对，从而产生 2 个抗原结合位点。例如，双抗体另外描述于 EP 404,097；WO 93/11161 和 Hollinger 等（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448。

[0204] “分离”抗体是从其天然环境组分中鉴定并分离和 / 或回收的抗体。其天然环境组

分可包括酶、激素和其它蛋白或非蛋白溶质。在一些实施方式中,分离的抗体纯化到(1)按罗氏蛋白质定量法所测定,抗体大于 95 重量%,例如大于 99 重量%,(2)纯化程度足以获得 N 末端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基,例如通过使用转杯测序仪,或(3)通过在还原或非还原条件下凝胶电泳(例如 SDS-PAGE),由考马斯蓝或银染检测达均质性。术语“分离”抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为将缺少所述抗体自然环境中的至少一种组分。在某些实施方式中,通过至少一个纯化步骤制备分离抗体。

[0205] 在一些实施方式中,抗体是人源化抗体或人抗体。人源化抗体包括人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体互补决定区(CDR)的残基由来自非人物种(供体抗体)如小鼠、大鼠或兔中具有所需特异性、亲和性和性能的 CDR 残基取代。因此,非人(例如小鼠)抗体的人源化形式是含有非人免疫球蛋白衍生最小序列的嵌合免疫球蛋白。所述非人序列主要位于可变区,具体在互补决定区(CDR)中。在一些实施方式中,人免疫球蛋白的 Fv 构架残基由相应的非人残基取代。人源化抗体还可包括在受体抗体或输入 CDR 或构架序列中都未发现的残基。在某些实施方式中,人源化抗体包括至少 1 种且通常 2 种可变区的几乎全部,其中全部或几乎全部 CDR 对应于非人免疫球蛋白且全部或几乎全部框架区是人免疫球蛋白共有序列的框架区。就本公开的目的而言,人源化抗体还可包括免疫球蛋白片段,如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或抗体的其它抗原结合亚序列。

[0206] 所述人源化抗体还可包括至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常为人免疫球蛋白的 Fc。参见例如 Jones 等(1986)Nature 321:522-525;Riechmann 等(1988)Nature 332:323-329;和 Presta(1992)Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596。

[0207] 本领域已知使非人抗体的人源化方法。一般,人源化抗体具有引自非人来源的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称为“输入”或“供体”残基,其一般获自“输入”或“供体”可变区。例如,可根据 Winter 和其同事的方法进行人源化,通过用啮齿动物 CDR 或 CDR 序列取代人抗体的对应序列。参见例如 Jones 等,同上;Riechmann 等,同上和 Verhoeyen 等(1988)Science 239:1534-1536。因此,这种“人源化”抗体包括嵌合抗体(美国专利第 4,816,567 号),其中显著少于完整人可变区的序列被非人物种的对应序列取代。在某些实施方式中,人源化抗体是其中一些 CDR 残基和可选的一些框架区残基由啮齿动物抗体(例如小鼠单克隆抗体)类似位点的残基取代的人抗体。

[0208] 例如,还可利用噬菌体展示库生成抗体。Hoogenboom 等(1991)J. Mol. Biol. 227:381;Marks 等(1991)J. Mol. Biol. 222:581。制备人单克隆抗体的其它方法描述于 Cole 等(1985)“Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy(《单克隆抗体和癌症治疗》)”ARL 出版社(Alan R. Liss),第 77 页,和 Boerner 等(1991)J. Immunol. 147:86-95。

[0209] 可通过将人免疫球蛋白位点基因座引入转基因动物(例如小鼠)来制备人抗体,该动物中内源免疫球蛋白基因已部分或完全灭活。免疫攻击时,观察到人抗体生成,其与人体中所见在各方面相类似,包括基因重排、拼装和抗体库。例如,此方法描述于美国专利号 5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016,以及以下科学出版物: Marks 等(1992)Bio/Technology 10:779-783(1992);Lonberg 等(1994)Nature 368:856-859;Morrison(1994)Nature 368:812-813;Fishwald 等(1996)Nature Biotechnology 14:845-851;Neuberger(1996)Nature Biotechnology 14:826;和 Lonberg 等(1995)Intern. Rev. Immunol. 13:65-93。

[0210] 可如上所述用已知的选择和 / 或突变方法使抗体亲和性成熟。在一些实施方式中,亲和性成熟抗体的亲和性是制备该成熟抗体的起始抗体(一般是小鼠、兔、鸡,人源化或人)亲和性的 5 倍或更高、10 倍或更高、20 倍或更高、或者 30 倍或更高。

[0211] 抗体还可双特异性抗体。双特异性抗体是对至少 2 种不同抗原有结合特异性的单克隆抗体,且可以是人或人源化抗体。本情况中,所述 2 种不同结合特异性可针对 2 种不同赖氨酰氧化酶型酶或单一赖氨酰氧化酶型酶上的 2 种不同表位。

[0212] 本文所述抗体还可以是免疫偶联物。这类免疫偶联物包括偶联第二分子如报告子的抗体(例如针对赖氨酰氧化酶型酶)。免疫偶联物还可包括与细胞毒性剂如化疗剂、毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,或其片段)或放射性同位素(例如提供放射偶联物)偶联的抗体。

[0213] “特异性结合”或“特异于”特定多肽或特定多肽表位的抗体结合该特定多肽或表位而不显著结合任何其它多肽或多肽表位。在一些实施方式中,本文的抗体特异性结合其靶标,以单克隆抗体、scFv、Fab 形式或其他抗体形式,在约 4℃、25℃、37℃或 42℃的温度下测得的解离常数(K_d)等于或小于 100nM,可选低于 10nM,可选低于 1nM,可选低于 0.5nM,可选低于 0.1nM,可选低于 0.01nM,或可选低于 0.005nM。

[0214] 在某些实施方式中,本文的抗体结合赖氨酰氧化酶型酶中的一个或多个加工位点(例如蛋白裂解位点),从而有效阻断酶原或前原酶加工成催化活性酶,以降低赖氨酰氧化酶型酶的活性。

[0215] 在某些实施方式中,和与其它赖氨酰氧化酶型酶如 LOXL1、LOXL3 和 LOXL4 的结合亲和性相比,本文所述的抗体结合人 LOX 和 / 或人 LOXL2 的亲和性更高,例如高 10 倍,至少 100 倍,或甚至至少 1000 倍。

[0216] 在某些实施方式中,本文所述的抗体是赖氨酰氧化酶型酶催化活性的非竞争性抑制剂。在某些实施方式中,本文所述的抗体在赖氨酰氧化酶型酶催化域外结合。在某些实施方式中,本文所述的抗体结合 LOXL2 的 SRCR4 结构域。在某些实施方式中,结合 LOXL2 的 SRCR4 结构域并用作非竞争性抑制剂的抗 LOXL2 抗体是本文和共有美国专利申请公开号 US 2009/0053224 及 US 2009/0104201 中所述的 AB0023 抗体。在某些实施方式中,结合 LOXL2 的 SRCR4 结构域并用作非竞争性抑制剂的抗 LOXL2 抗体是本文和共有美国专利申请公开号 US 2009/0053224 及 US 2009/0104201 中所述的 AB0024 抗体(AB0023 抗体的人形式)。

[0217] 可选地,本文所述的抗体不仅结合赖氨酰氧化酶型酶,还减少或抑制赖氨酰氧化酶型酶的摄取或内化,例如经整合蛋白 $\beta 1$ 或其它细胞受体或蛋白。例如,这种抗体可以结合胞外基质蛋白、细胞受体和 / 或整合蛋白。

[0218] 共有的美国专利申请公开号 US 2009/0053224 和 US 2009/0104201 中提供了对识别赖氨酰氧化酶型酶的示例性抗体和涉及赖氨酰氧化酶型酶抗体的其它说明,所述专利申请通过引用纳入用以描述赖氨酰氧化酶型酶抗体、其生产和应用。

[0219] 调节赖氨酰氧化酶型酶的多核苷酸

[0220] 反义

[0221] 可通过下调赖氨酰氧化酶转录或翻译水平的表达来实现赖氨酰氧化酶型酶的调节(例如抑制)。一种这类调节方法包括使用能序列特异性结合编码赖氨酰氧化酶型酶的 mRNA 转录物的反义寡核苷酸或多聚核苷酸。

[0222] 反义寡核苷酸（或反义寡核苷酸类似物）与靶 mRNA 分子的结合可导致胞内 RNA 酶 H 酶切割所述杂交体。在某些情况中，形成反义 RNA-mRNA 杂交体可干扰正确剪接。这两种情况中，适合翻译的完整、功能性靶 mRNA 数量减少或消去。在其它情况中，反义寡核苷酸或寡核苷酸类似物与靶 mRNA 的结合可防止（例如通过位阻）核糖体结合，从而防止 mRNA 翻译。

[0223] 反义寡核苷酸可包括任何核苷酸亚基类型，例如它们可以是 DNA，RNA，类似物如肽核酸（PNA），或上述的混合物。RNA 寡核苷酸与靶 mRNA 分子形成更稳定的双链体，但未杂交的寡核苷酸在胞内的稳定性低于其它类型的寡核苷酸和寡核苷酸类似物。这可通过利用为此目的设计的载体在细胞内表达 RNA 寡核苷酸来抵消。例如，此方法可用于尝试靶向编码高丰度且长寿命蛋白的 mRNA。

[0224] 设计反义寡核苷酸时可考虑其它方面，包括：(i) 结合靶序列的充分特异性；(ii) 溶解性；(iii) 抵御胞内和胞外核酸酶的稳定性；(iv) 穿透细胞膜的能力；和 (v) 用于处理生物体时的低毒性。

[0225] 已有算法根据引起靶 mRNA 和寡核苷酸结构改变能量的热动力学循环来鉴定与靶 mRNA 具有最高预测结合亲和性的寡核苷酸序列。例如，Walton 等 (1999) *Biotechnol. Bioeng.* 65:1-9 使用这种方法设计针对兔-球蛋白 (RBG) 和小鼠肿瘤坏死因子-(TNF) 转录物的反义寡核苷酸。同一研究组还报道了细胞培养中针对 3 种模型靶 mRNA (人乳酸脱氢酶 A 和 B 及大鼠 gp130) 所合理选定的寡核苷酸的反义活性在几乎所有情况中证实有效。这包括在 2 种细胞类型中使用通过磷酸二酯和硫代磷酸化学制备的寡核苷酸针对 3 种不同靶标的测试。

[0226] 此外，有多种利用体外系统设计和预测特定寡核苷酸功效的方法。参见例如，Matveeva 等 (1998) *Nature Biotechnology* 16:1374-1375。

[0227] 本文所述的反义寡核苷酸包括具有至少 10 个核苷酸的多聚核苷酸或多聚核苷酸类似物，例如，具有 10-15 个、15-20 个、至少 17 个、至少 18 个、至少 19 个、至少 20 个、至少 22 个、至少 25 个、至少 30 个或甚至至少 40 个核苷酸。这种多聚核苷酸或多聚核苷酸类似物能在生理条件下与编码赖氨酰氧化酶型酶如 LOX 或 LOXL2 的 mRNA 在体内退火或杂交（即基于碱基互补性形成双链结构）。

[0228] 本文所述的反义寡核苷酸可由给予细胞或组织的核酸构建物表达。可选地，反义序列表达受诱导型启动子控制，从而反义序列的表达可在细胞或组织中打开和关闭。或者，反义寡核苷酸可化学合成并直接给予细胞或组织，例如，作为药物组合物的一部分。

[0229] 反义技术可产生高度精确的反义设计算法和各种寡核苷酸递送系统，从而使本领域普通技术人员能设计和实施适于下调已知序列表达的反义方法。涉及反义技术的其它信息参见例如 Lichtenstein 等“*Antisense Technology: A Practical Approach* (《反义技术：实践方法》)”牛津大学出版社 (Oxford University Press), 1998。

[0230] 小 RNA 和 RNAi

[0231] 抑制赖氨酰氧化酶型酶活性的另一方法是 RNA 干扰 (RNAi)，该方法使用与靶 mRNA 同源并导致其降解的双链小干扰 RNA (siRNA) 分子。Carthew (2001) *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13:244-248。

[0232] RNA 干扰通常是两步法。在称为起始步骤的第一步中，输入 dsRNA 被消化成 21-23

个核苷酸 (nt) 的小干扰 RNA (siRNA), 这可能是通过双链特异性核糖核酸酶 RNA 酶 III 家族成员切酶 (Dicer) 的作用, 该酶以 ATP 依赖性方式切割双链 RNA。例如, 输入 RNA 可直接或者经转基因或病毒递送。连续切割事件使 RNA 降解成 19-21bp 双链体 (siRNA), 各具有 2- 核苷酸的 3' 突出端。Hutvagner 等 (2002) Curr. Opin. Genet. Dev. 12 :225-232 ;Bernstein (2001) Nature 409 :363-366。

[0233] 在第二个效应步骤中, siRNA 双链体结合核酸酶复合体以形成 RNA 诱导沉默复合体 (RISC)。激活 RISC 需要 siRNA 双链体的 ATP 依赖性解旋。然后, 活性 RISC (含有单一 siRNA 和 RNA 酶) 通过碱基配对相互作用靶向同源转录物且通常将 mRNA 从 siRNA 的 3' 末端起切割成约 12 个核苷酸的片段。Hutvagner 等, 同上 ;Hammond 等 (2001) Nat. Rev. Gen. 2 :110-119 ;Sharp (2001) Genes. Dev. 15 :485-490。

[0234] RNAi 和 相 关 方 法 也 描 述 于 Tuschl (2001) Chem. Biochem. 2 :239-245 ; Cullen (2002) Nat. Immunol. 3 :597-599 ; 和 Brantl (2002) Biochem. Biophys. Acta. 1575 :15-25。

[0235] 适用于本文作为赖氨酰氧化酶型酶活性抑制剂的 RNAi 分子的示例性合成策略是扫描起始密码子下游合适 mRNA 序列的 AA 二核苷酸序列。各 AA 和所述下游 (即 3' 毗邻) 19 个核苷酸记录为潜在 siRNA 靶位点。优选编码区的靶位点, 因为结合 mRNA 未翻译区 (UTR) 的蛋白和 / 或翻译起始复合体可干扰 siRNA 内切核酸酶复合体的结合。Tuschl (2001), 同上。但应理解, 针对非翻译区的 siRNA 也可有效, 已证实针对 GAPDH 基因 5' UTR 的 siRNA 介导细胞 GAPDH mRNA 降低约 90% 且完全消除蛋白水平 (www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html)。一旦如上所述获得一组潜在靶位点, 使用序列比对软件 (如获自 NCBI 的 BLAST 软件, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 比较潜在靶标的序列与合适基因组数据库 (例如人、小鼠、大鼠等)。排除与其它编码序列有显著同源性的潜在靶位点。

[0236] 选择合格的靶序列作为 siRNA 合成模板。选定序列可包括低 G/C 含量的序列, 因为这些序列在调节基因沉默中显示比 G/C 含量高于 55% 的序列更有效。可沿靶基因长度选择多个靶位点用于评估。为了更好地评估选定 siRNA, 组合使用阴性对照。阴性对照 siRNA 可包括核苷酸组成与测试 siRNA 相同, 但与所述基因组缺乏显著同源性的序列。因此, 例如, 可使用 siRNA 的混杂核苷酸序列, 只要它不显示与任何其它基因的显著同源性。

[0237] 本文的 siRNA 分子可从表达载体中转录, 所述载体一旦引入宿主细胞能促进 siRNA 转录物的稳定表达。这些载体经工程改造以表达小发夹 RNA (shRNA), shRNA 在体内加工成能实施基因特异性沉默的 siRNA 分子。参见例如 Brummelkamp 等 (2002) Science 296 :550-553 ;Paddison 等 (2002) Genes Dev. 16 :948-958 ;Paul 等 (2002) Nature Biotech. 20 :505-508 ;Yu 等 (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 :6047-6052。

[0238] 小发夹 RNA (shRNA) 是形成双链、发夹环结构的单链多核苷酸。所述双链区由第一序列和第二序列形成, 所述第一序列可与靶序列如编码赖氨酰氧化酶型酶的多核苷酸 (例如 LOX 或 LOXL2 mRNA) 杂交, 所述第二序列与所述第一序列互补。所述第一和第二序列形成双链区 ;而位于第一和第二序列之间的未碱基对接头核苷酸形成发夹环结构。shRNA 的双链区 (茎) 可包括限制性内切核酸酶识别位点。

[0239] shRNA 分子可具有可选的核苷酸突出端, 如 2-bp 突出端, 例如 3' UU- 突出端。尽管可有变化, 茎长度范围通常为约 15-49、约 15-35、约 19-35、约 21-31bp, 或约 21-29bp, 环

大小范围可为约 4-30bp,例如约 4-23bp。

[0240] 对于细胞内的 shRNA 表达,可采用含启动子(例如 RNA 聚合酶 III H1-RNA 启动子或 U6RNA 启动子)、插入 shRNA 编码序列的克隆位点和转录终止信号(例如 4-5 个腺嘌呤-胸腺嘧啶碱基对的延伸)的质粒载体。聚合酶 III 启动子一般具有明确的转录起始和终止位点,其转录物缺乏聚(A)尾。这些启动子的终止信号由聚胸腺嘧啶道确定,所述转录物通常在第二编码尿苷后切割。此位置的切割在所表达 shRNA 中产生 3'UU 突出端,其与合成 siRNA 的 3' 突出端类似。上面引用的参考文献描述了在哺乳动物细胞中表达 shRNA 的其它方法。

[0241] 合适 shRNA 表达载体的一个示例是 pSUPER™(华盛顿州西雅图的 OE 有限公司(Oligoengine, Inc.)),包括具有明确转录起始位点和终止信号的聚合酶 III H1-RNA 基因启动子,所述终止信号由 5 个连续腺嘌呤-胸腺嘧啶对组成。Brummelkamp 等,同上。在第二尿苷(在终止序列编码的 5 个之中)后的位点切割转录产物,产生类似合成 siRNA 末端的转录物,其还包含核苷酸突出端。将待转录成 shRNA 的序列克隆入这类载体,从而它们产生的转录物含有通过短接头相隔开的第一序列和第二序列,所述第一序列与部分 mRNA 靶标(例如编码赖氨酰氧化酶型酶的 mRNA)互补的第一序列,所述第二序列含有第一序列的反向互补序列。所得转录物自身向后折叠以形成介导 RNA 干扰(RNAi)的茎-环结构。

[0242] 另一合适的 siRNA 表达载体在单独 pol III 启动子调控下编码有义和反义 siRNA。Miyagishi 等(2002)Nature Biotech. 20:497-500。此载体产生的 siRNA 还包括 5 个胸腺嘧啶(T5)的终止信号。

[0243] siRNA、shRNA 和/或其编码载体可通过多种方法引入细胞,例如脂转染。还开发了载体介导的方法。例如,可用逆转录病毒将 siRNA 分子递送到细胞内。在某些情况下,用逆转录病毒递送 siRNA 可提供优势,因为逆转录病毒递送能有效、均一且可立即选择稳定“敲减”细胞。Devroe 等(2002)BMC Biotechnol. 2:15。

[0244] 近期科学出版物证实这种短双链 RNA 分子在抑制靶 mRNA 表达中的功效并因而清楚证明这类分子的治疗潜力。例如,已利用 RNAi 抑制感染丙肝病毒的细胞(McCaffrey 等(2002)Nature 418:38-39)、HIV-1 感染细胞(Jacque 等(2002)Nature 418:435-438)、宫颈癌细胞(Jiang 等(2002)Oncogene 21:6041-6048)和白血病细胞(Wilda 等(2002)Oncogene 21:5716-5724)。

[0245] 调节赖氨酰氧化酶型酶表达的方法

[0246] 调节赖氨酰氧化酶型酶活性的另一方法是调节其编码基因的表达,如果基因表达受到抑制则产生较低水平的活性,如果基因表达激活则产生较高水平的活性。可通过多种方法实现细胞中基因表达的调节。

[0247] 例如,通过链置换或三螺旋形成结合基因组 DNA(例如赖氨酰氧化酶型基因的调控区)的寡核苷酸可阻断转录,从而防止赖氨酰氧化酶型酶表达。对此,描述了所谓“转回”化学连接的用途,其中寡核苷酸识别其靶标一条链上的聚嘌呤延伸和另一链上的同型嘌呤序列。还可使用含人工碱基的寡核苷酸获得三螺旋形成,从而扩展了涉及离子强度和 pH 的结合条件。

[0248] 例如,赖氨酰氧化酶型酶编码基因的转录调节还可通过将含功能结构域和 DNA 结合域的融合蛋白、或编码这种融合蛋白的核酸引入细胞。例如,功能结构域可以是转录激活

域或转录抑制域。示例性转录激活域包括 VP16、VP64 和 NF- κ B 的 p65 亚基；示例性转录抑制域包括 KRAB、KRX 和 v-erbA。

[0249] 在某些实施方式中，这类融合蛋白的 DNA 结合域部分是在赖氨酰氧化酶型酶编码基因或其附近结合、或在该基因调控区结合的序列特异性 DNA 结合域。DNA 结合域可天然结合于基因或调控区或其毗邻序列，或者可改造成如此结合。例如，可从天然产生的蛋白中获得所述 DNA 结合域，所述蛋白调节赖氨酰氧化酶型酶编码基因的表达。或者，所述 DNA 结合域可改造成结合在赖氨酰氧化酶型酶编码基因内或其附近或者该基因调控区中的选择序列。

[0250] 锌指 DNA 结合域对此有用，因为能改造锌指蛋白以结合任何选择的 DNA 序列。锌指结合域包括一种或多种锌指结构。Miller 等 (1985)EMBO J 4:1609-1614；Rhodes (1993)Scientific American, 2 月:56-65；美国专利第 6,453,242 号。通常，单个锌指长约 30 个氨基酸且包含 4 个锌-配位氨基酸残基。结构研究证明典型 (C_2H_2) 锌指基序包含堆积靠向 α 螺旋（一般包含 2 个锌-配位组氨酸残基）的 2 个 β 片层（保持于 β 转角，一般含有 2 个锌-配位半胱氨酸残基）。

[0251] 锌指包括典型 C_2H_2 锌指（即其中锌离子通过 2 个半胱氨酸和 2 个组氨酸残基配位）和非典型锌指，例如 C_3H 锌指（其中锌离子通过 3 个半胱氨酸残基和 1 个组氨酸残基配位）和 C_4 锌指（其中锌离子通过 4 个半胱氨酸残基配位）。非典型锌指还可包括其中非半胱氨酸或组氨酸的氨基酸取代这些锌-配位残基之一的锌指。参见例如 WO 02/057293 (2002 年 7 月 25 日) 和 US 2003/0108880 (2003 年 6 月 12 日)。

[0252] 可改造锌指结合域以具有和天然产生锌指蛋白相比的新结合特异性；从而可构建改造成结合选择序列的锌指结合域。参见例如 Beerli 等 (2002)Nature Biotechnol. 20:135-141；Pabo 等 (2001)Ann. Rev. Biochem. 70:313-340；Isalan 等 (2001)Nature Biotechnol. 19:656-660；Segal 等 (2001)Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637；Choo 等 (2000)Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416。改造方法包括但不限于合理设计和各种经验选择方法。

[0253] 例如，合理设计包括使用含三联（或四联）核苷酸序列和个体锌指氨基酸序列的数据库，其中三联或四联核苷酸序列各与一个或多个结合具体三联或四联序列的锌指氨基酸序列相关联。参见例如美国专利号 6,140,081；6,453,242；6,534,261；6,610,512；6,746,838；6,866,997；7,030,215；7,067,617；美国专利申请公开号 U.S. 2002/0165356；2004/0197892；2007/0154989；2007/0213269；和国际专利申请公开号 WO 98/53059 和 WO 2003/016496。

[0254] 示例性选择方法包括噬菌体展示、相互作用陷阱、杂交选择和双杂交系统，其公开于美国专利号 5,789,538；5,925,523；6,007,988；6,013,453；6,140,466；6,200,759；6,242,568；6,410,248；6,733,970；6,790,941；7,029,847 和 7,297,491；以及美国专利申请公开号 2007/0009948 和 2007/0009962；WO 98/37186；WO 01/60970 和 GB 2,338,237。

[0255] 例如，提高锌指结合域的结合特异性描述于美国专利号 6,794,136 (2004 年 9 月 21 日)。涉及指间接头序列的其它锌指改造方面公开于美国专利号 6,479,626 和美国专利申请公开号 2003/0119023。还参见例如 Moore 等 (2001a)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:1432-1436；Moore 等 (2001b)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:1437-1441 和 WO 01/53480。

[0256] 关于使用含经改造锌指 DNA 结合域的融合蛋白的更多细节参见例如美国专利 6,534,261 ;6,607,882 ;6,824,978 ;6,933,113 ;6,979,539 ;7,013,219 ;7,070,934 ;7,163,824 和 7,220,719。

[0257] 调节赖氨酰氧化酶型酶表达的其它方法包括定向诱变基因或控制该基因表达的调控区。例如,在美国专利申请公开 2005/0064474、2007/0134796 和 2007/0218528 中提供了使用含核酸酶结构域和改造 DNA 结合域的融合蛋白的定向诱变的示例性方法。

[0258] 制剂、药盒和给予途径

[0259] 还提供了含鉴定为赖氨酰氧化酶型酶活性调节剂(例如赖氨酰氧化酶型酶的抑制剂或激活剂)的化合物的治疗组合物。这些组合物通常包括调节剂和药学上可接受的载体。补充的活性化合物也可纳入所述组合物。可使用赖氨酰氧化酶型酶的活性调节剂,特别是抑制剂,例如与化疗剂或抗肿瘤剂联用以减少或去除结缔组织形成和/或成纤维细胞激活。因此,本文所述治疗组合物可包含赖氨酰氧化酶型酶活性调节剂和一种或多种化疗剂或抗肿瘤剂。在其它实施方式中,治疗性组合物包括治疗有效量的赖氨酰氧化酶型酶活性调节剂,但不含有化疗剂或抗肿瘤剂,所述组合物与化疗剂或抗肿瘤剂分开给予。

[0260] 本文所用的术语“治疗有效量”或“有效量”指单独或与另一治疗剂联合给予细胞、组织或对象(例如哺乳动物如人或非人动物,如灵长类动物、啮齿动物、牛、马、猪、羊等)时,有效防止或缓解疾病病症或疾病进展的治疗剂含量。治疗有效剂量还指足以引起症状完全或部分缓解如治疗、治愈、防止或缓解相关医学病症或者治疗、治愈、防止或缓解这些病症的速度提高的化合物量。例如,赖氨酰氧化酶型酶活性抑制剂的治疗有效量随着疾病或紊乱类型、疾病或紊乱的广泛性、患有疾病或紊乱的生物体大小而改变。

[0261] 本文所述治疗组合物用于减少由肿瘤生长和/或纤维化引起的结缔组织形成等。因此,赖氨酰氧化酶型酶(例如 LOXL2)活性调节剂(例如抑制剂)的“治疗有效量”是引起结缔组织形成和/或结缔组织形成相关症状减轻的量。例如,当赖氨酰氧化酶抑制剂是抗体且所述抗体在体内给予时,取决于例如体重、给予途径、疾病严重性等,正常剂量可从每天约 10ng/kg 变化到多至 100mg/kg 哺乳动物体重或更高,例如约 1 微克/千克/天-50 毫克/千克/天,如约 30 毫克/千克/天,任选约 100 微克/千克/天-20 毫克/千克/天,500 微克/千克/天-10 毫克/千克/天,或 1 毫克/千克/天-10 毫克/千克/天。还可不按每日方案来给予剂量,例如每周一次,每周二次,每周三次,每 10 天一次,每两周一次,或每月一次。剂量可以例如从每剂量约 10ng/kg 到多至 100mg/kg 哺乳动物体重或更高,例如约 1 微克/千克/剂量-50 毫克/千克/剂量,如约 30 毫克/千克/剂量,任选约 100 微克/千克/剂量-20 毫克/千克/剂量,500 微克/千克/剂量-10 毫克/千克/剂量,或 1 毫克/千克/剂量-10 毫克/千克/剂量,或约 15 毫克/千克/剂量。在一个实施例中,剂量为约 15/毫克/千克,每周给予两次。治疗期可为例如 2 周、3 周、4 周、5 周、6 周、7 周、8 周、9 周、10 周、11 周、12 周、13 周或 14 周或更久。剂量方案可包括每两周给予某剂量(例如从每剂量约 10ng/kg 到多至 100mg/kg 哺乳动物体重或更高,例如约 1 微克/千克/剂量-50 毫克/千克/剂量,如约 30 毫克/千克/剂量,任选约 100 微克/千克/剂量-20 毫克/千克/剂量,500 微克/千克/剂量-10 毫克/千克/剂量,或 1 毫克/千克/剂量-10 毫克/千克/剂量,或约 15 毫克/千克/剂量)。

[0262] 赖氨酰氧化酶型酶活性调节剂与化疗剂或抗肿瘤剂联用时,也可以指所述组合的

治疗有效剂量,该剂量是引起结缔组织形成减少的所述调节剂与化疗剂或抗肿瘤剂的组合量,无论是组合、依序或同时给予。大于一种的浓度组合可以是治疗有效的。

[0263] 根据本公开,本领域技术人员已知各种药物组合物和其制备及应用技术。合适药物组合物和其给予技术的详细列表可参见本文的详细说明,并可由例如以下的教材进一步补充:Remington's Pharmaceutical Sciences(《雷明顿药物科学》),第17版,1985;Brunton等,“Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics(《古德曼吉尔曼治疗学的药理学基础》)”,麦格劳希尔公司(McGraw-Hill),2005;费城科学大学(编),“Remington:The Science and Practice of Pharmacy(《雷明顿:药物科学和实践》)”,LWW出版社(Lippincott Williams & Wilkins),2005;和费城科学大学(编),“Remington:The Principles of Pharmacy Practice(《雷明顿:药物实践原理》)”,LWW出版社,2008。

[0264] 公开的治疗组合物还包括药学上可接受的材料、组合物或载剂,如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料,即运载体。这些运载体参与将主题调节剂从一个器官或机体区域转运到另一器官或机体区域。各运载体从与制剂的其它成分的相容性和对患者无害的意义上而言应“可接受”。能用作药学上可接受运载体的材料的一些示例包括:糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和土豆淀粉;纤维素和其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;黄蓍胶粉;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,如可可油和栓剂蜡;油,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,如丙二醇;多元醇,如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;酯,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;藻酸;无热原水;等渗盐水;林格溶液;乙醇;磷酸盐缓冲液;和药物制剂中采用的其它无毒相容性物质。所述组合物中还可存在湿润剂,乳化剂和润滑剂如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂,释放剂,涂覆剂,甜味剂,增味剂和芳香剂,防腐剂和抗氧化剂。

[0265] 本文的另一方面涉及给予赖氨酰氧化酶型酶活性调节剂的药盒。本文的另一方面涉及组合给予赖氨酰氧化酶型酶活性调节剂和化疗剂或抗肿瘤剂的药盒。在一个实施方式中,药盒包括配制于药物运载体中的赖氨酰氧化酶型酶活性抑制剂(例如LOXL2抑制剂,如抗LOXL2抗体),可选含有至少一种化疗剂或抗肿瘤剂,适当配制成一种或多种单独药物制剂。

[0266] 制剂和递送方法可根据结缔组织形成的位置和程度调整。示例性制剂包括但不限于适于胃肠外给药例如静脉内、动脉内、眼内或皮下给药的制剂,包括包封于胶束、脂质体或药物释放胶囊(活性药剂纳入设计用于缓慢释放的生物相容性包衣内)的制剂;可摄取的制剂;外用制剂,如滴眼剂、乳膏、油膏和凝胶;和其它制剂如吸入剂、气溶胶和喷雾剂。本文的化合物剂量根据治疗需求的程度和严重性、所给予组合物的活性、对象的整体健康状况和技术人员熟知的其它考量而变化。

[0267] 可给予治疗组合物以通过任何适当途径减少肿瘤生长引起的结缔组织形成,所述途径使组合物沿着相邻间质组织递送到肿瘤-间质界面(即肿瘤周边(例如肿瘤囊))和/或肿瘤外间质组织。

[0268] 在其它实施方式中,本文所述组合物局部递送。局部递送可使组合物非全身递送到例如伤口或纤维化区域,比全身递送降低了组合物的身体负担。例如,这种局部递送可通

过使用各种医疗植入装置实现或者通过注射或手术实现,所述装置包括但不限于支架和导管。本领域已确立包封、植入、包埋、和使所需药剂附于医疗装置如支架和导管的其它方法,本文已考虑。

[0269] 抗 LOXL2 抗体

[0270] 针对 LOXL2 的单克隆抗体描述于共有的美国专利申请公开号 US 2009/0053224(2009 年 2 月 26 日)。此抗体命名为 AB0023。感兴趣的抗体是所含重链具有 AB0023 的 CDR(CDR1、CDR2 和 CDR3) 和所含轻链具有 AB0023 的 CDR(CDR1、CDR2 和 CDR3) 的抗体。其重链可变区的 CDR 和间插构架区序列如下 (CDR1、CDR2 和 CDR3 的序列有下划线) :

[0271] MEWSRVFIFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTYYLI

[0272] EWVKQRPQGGLWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSL

[0273] TSDDSAVYFCARNWMNFYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO :1)

[0274] 还提供了与 SEQ ID NO :1 的同源性为 75%或更高、80%或更高、90%或更高、95%或更高、或 99%或更高的其它重链可变区氨基酸序列。

[0275] AB0023 抗体轻链可变区的 CDR 和间插构架区序列是 (CDR1、CDR2 和 CDR3 的序列有下划线) :

[0276] MRCLAEFLGLLVLPGAIGDIVMTQAAPSVSVTPGESVSISCRSSKSLHLSNG

[0277] NTYLYWFLQRPQGSPQFLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDV

[0278] GVYYCMQHLEYPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO :2)

[0279] 还提供了与 SEQ ID NO :2 的同源性为 75%或更高、80%或更高、90%或更高、95%或更高、或 99%或更高的其它轻链可变区氨基酸序列。

[0280] 上述抗 LOXL2 单克隆抗体的人源化形式描述于共有的美国专利申请公开号 US 2009/0053224(2009 年 2 月 26 日)。示例性人源化抗体命名为 AB0024。感兴趣的人源化抗体是所含重链具有 AB0024 的 CDR(CDR1、CDR2 和 CDR3) 和所含轻链具有 AB0024 的 CDR(CDR1、CDR2 和 CDR3) 的抗体。其重链可变区的 CDR 和间插构架区序列如下 (CDR1、CDR2 和 CDR3 的序列有下划线) :

[0281] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTYYLIEWVRQAPGQGLEWIGVIN

[0282] PGSGGTNYNEKFKGKGRATITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARNWMNF

[0283] YWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO :3)

[0284] 还提供了与 SEQ ID NO :3 的同源性为 75%或更高、80%或更高、90%或更高、95%或更高、或 99%或更高的其它重链可变区氨基酸序列。

[0285] AB0024 抗体轻链可变区的 CDR 和间插构架区序列是 (CDR1、CDR2 和 CDR3 的序列有下划线) :

[0286] DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSKSLHLSNGNTYLYWFLQKPGQSPQFLIYR

[0287] MSNLASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGT

[0288] KVEIK (SEQ ID NO :4)

[0289] 还提供了与 SEQ ID NO :4 的同源性为 75%或更高、80%或更高、90%或更高、95%或更高、或 99%或更高的其它轻链可变区氨基酸序列。

[0290] 共有的美国专利申请公开号 US 2009/0053224(2009 年 2 月 26 日) 公开了其它

抗 LOXL2 抗体序列包括可变区、构架区氨基酸序列和互补决定区氨基酸序列的其它人源化形式,所述专利申请的公开通过引用全文纳入本文用以提供各种抗 LOXL2 抗体的氨基酸序列。

实施例

[0291] 实施例 1 :组织和细胞系

[0292] 细胞系获自 ATCC(弗吉尼亚州的马纳萨斯)且根据实验维持于 DMEM+10% FBS 或无血清 DMEM 中。

[0293] 实施例 2 :构建体和表达载体

[0294] 产生人、大鼠和猕猴 LOXL2 表达载体

[0295] 通过 PCR 从正常大鼠 cDNA(心、肾、骨骼肌和结肠 cDNA 的混合物,美国博诚研究中心(Biochain Institute))中克隆大鼠 LOXL2,使用 Platinum Pfx DNA 聚合酶(英杰公司(Invitrogen))和引物 5' atggagatcccttttggtc 3' (SEQ ID NO:5) 和 5' ttactgcacagagagctgatta3' (SEQ ID NO:6)。在 94°C 起始孵育 4 分钟后,运行 94°C 15 秒、55°C 30 秒和 68°C 2.5 分钟的 30 轮 PCR。PCR 片段经凝胶纯化(凝胶提取试剂盒,凯杰公司(Qiagen))并验证序列(MCLab,加利福尼亚州的南旧金山)。正确的克隆通过 PCR 使用引物 5' atagctagcgcaccatggagatcccttttggtc 3' (SEQ ID NO:7) 和 5' tatactcagtgctgcacagagagctgattatttag3' (SEQ ID NO:8) 扩增(如上所述,但进行 18 轮),克隆到 pSecTag2hygro-B(英杰公司)中 NheI 和 XhoI 位点处,并验证序列。猕猴 LOXL2 通过 PCR(如上所述)从正常 cDNA(胃、肾、结肠、阴茎和骨骼肌 cDNA 的混合物,美国博诚研究中心)中克隆,使用引物 5' cctgtcccccctgagcctggcacag3' (SEQ ID NO:9) 和 5' ttactgcggggagagctgggtgttcaagag3' (SEQ ID NO:10)(产生具有不完整信号肽的片段),正确的 ORF 序列通过多重 PCR 反应的比对来确定。所述序列克隆到 pSecTag2hygro 载体中(切除外源信号肽)在 SfiI 和 NotI 位点,使用引物 5' tataggcccagccggcccagtagacagctggccc3' (SEQ ID NO:11) 和 5' tatagcgccgcctgcggggagagctgggttg3' (SEQ ID NO:12),并验证序列(MCLab)。人 LOXL2 由复能基因公司(Genecopoeia,马里兰州德国镇)组装入 pReceiverM08 载体并包含血凝素(HA)和 his6 标签。无催化活性的 LOXL2 由 GeraNeufeld 实验室(Technion,以色列理工学院)馈赠,其在赖氨酸酪氨酸(LTQ)区中具有 Y689F 突变。

[0296] 实施例 3 :抗体生成和纯化

[0297] 杂交瘤细胞在低 IgG DMEM、10%胎牛血清、含青霉素/链霉素、5%杂交瘤克隆因子和 HT 培养基补充物中生长。BALB/c 小鼠中产生腹水,通过含 MabSelect 树脂(GE 健康公司(GE Health))的填充床层析纯化抗体。分批结合后,收集流通物且用 10 倍柱体积的 pH 7.4 的 PBS 清洗树脂。用 pH 3 的 0.1M 柠檬酸洗脱抗体。用 1:10 体积 0.1M Tris pH 8.0 中和洗脱物并在 0.01%吐温 20/PBS 中 4°C 透析过夜。

[0298] 小鼠抗人 LOXL2 抗体(AB0023)通过用全长 LOXL2 蛋白免疫而获得,并经 SEC-HPLC(Tosoh TSKGEL G3000SWXL 7.8X300)纯化。采用分析型尺寸排阻层析评价抗体稳定性和纯度。在 SDS-PAGE 考马斯(英杰公司 BT 4-12%凝胶)还原和非还原凝胶上运行纯化的 AB0023 以评估纯度。通过 ELISA 检测效力以测定 Kd,用 Amplex Red 实验(分子探针(Molecular Probes)/英杰公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德)测定对 LOXL2 酶活性的影响。

通过 280nm 吸光度测量抗体浓度,所用消光系数 Abs 0.1% 为 1.4。用等电聚焦(英杰公司 pH 3-10IEF 凝胶)进行身份鉴定分析。对于安全分析,以 0.01-1EU/ml 的敏感度测量内毒素水平(查尔斯河实验室(Charles River)EndoSafe PTS)。

[0299] 用具有氨基酸序列 DTYERPRPGGRYPGC(SEQ ID NO:13)的肽来免疫获得抗 LOX 抗体。

[0300] 实施例 4:纯化 LOXL2 和 LOXL2 片段

[0301] Ni-琼脂糖凝胶(GE 医疗保健公司(GE Healthcare))树脂用 0.1M Tris-HCL pH 8.0 平衡。将条件培养基上样到已平衡的树脂上。上样后,用 0.1M Tris-HCL pH 8.0、0.25M NaCl、0.02M 咪唑清洗镍亲和柱。用 0.1M Tris pH 8.0、0.150M NaCl、0.3M 咪唑进行洗脱。用 4-12% BisTris 凝胶(英杰公司)进行还原样品上的 SDS-PAGE 以测定纯度。然后将纯化蛋白在 0.05M 硼酸盐 pH 8.0 中 4℃透析过夜。

[0302] 实施例 5:免疫荧光实验

[0303] 罗丹明鬼笔环肽染色

[0304] 在染色日之前 24 小时,细胞以 80%融合度接种于 8 腔室玻片。24 小时后,吸出培养基并用 PBS 清洗腔室。然后将细胞用 4%多聚甲醛(PFA)室温固定 20 分钟,随后用 0.5% 皂苷(JT 贝克公司(JT Baker),新泽西州菲利普斯堡)室温渗透 5 分钟。然后将细胞用 1:100 稀释的罗丹明鬼笔环肽(英杰公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德)室温染色 15 分钟。用 Vectashield(载体实验室公司(Vector Laboratories),加利福尼亚州伯林盖姆)封固玻片。

[0305] LOX、LOXL2 和 I 型胶原的共定位:免疫荧光

[0306] 将 Hs578t 细胞接种于 8 腔室载玻片(BD 珐康公司(BD Falcon),新泽西州富兰克林湖)并孵育过夜。就低融合度而言,细胞以 30-40,000 个细胞/玻片接种。采用低融合度条件检测接种 24 小时后胞质中的 LOX。就高融合度而言,细胞以 100,000 个细胞/玻片接种。采用高融合度条件检测接种约 48-72 小时后的基质关联 LOX 和胶原。

[0307] 细胞孵育 24 小时后,将抗 LOX 或抗 LOXL2mAb 在常规生长培养基中加至玻片,终浓度为 1μg/ml,玻片孵育约 24 小时。24 小时后,移除培养基,用 1xPBS 清洗细胞。然后,细胞在 4%多聚甲醛(PFA)中室温固定 20 分钟。对于胶原检测,在用 4% PFA 固定细胞前 1 小时加入抗胶原抗体(1:50 抗 I 型胶原兔多克隆,新泽西州吉布斯敦的卡尔生物化学公司(Calbiochem))并用抗兔 Cy3(杰克逊免疫实验室(ImmunoJackson Labs),宾夕法尼亚州西格洛夫)作为第二抗体来检测。

[0308] 通过室温下加入皂苷缓冲液(含 0.5%皂苷/1% BSA 的 PBS)到细胞并孵育 20 分钟使细胞透化。第二抗体(Alexa Fluor 488 驴抗小鼠 IgG,加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司)在室温下加入皂苷缓冲液并孵育 30-45 分钟。细胞在皂苷缓冲液中清洗 3 次,然后用 Vectashield(载体实验室公司,加利福尼亚州伯林盖姆)封固。

[0309] 实施例 6:基于细胞的实验

[0310] 制备用于蛋白质印迹分析的细胞裂解物和条件培养基样品

[0311] Hs578T、MDA-MB-231、MCF7、A549 和 HFF 细胞系在补充有 10% FBS(PAA,加拿大安大略的怡陶碧谷)和 L-谷氨酰胺(密迪亚泰克有限公司(Mediatech),弗吉尼亚州马纳萨斯)的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DMEM,弗吉尼亚州马纳萨斯)中培养。细胞在常氧

(95%空气, 5% CO₂) 或低氧 (2% O₂, 5% CO₂, 用 N₂ 平衡) 条件下 37℃ 培养。收集条件培养基 (无 FBS 的 DMEM) 并用 Amicon Ultra-4 (密理博公司, 马萨诸塞州比尔里卡) 浓缩。刮下细胞、在 8M 尿素 (溶于 16mM Na₂HPO₄) 中涡旋振荡并超声处理。然后用 Amicon Ultra-15 (密理博公司, 马萨诸塞州比尔里卡) 浓缩细胞裂解物。浓缩的条件培养基和细胞裂解物与 SDS 样品缓冲液 (波士顿生物制品公司 (Boston Bioproducts), 马萨诸塞州伍斯特) 混合并在 95℃ 煮沸 5 分钟。

[0312] 通过含 LOXL2 的培养基诱导 EMT 样表型:

[0313] 在接触条件培养基 (CM) 前 24 小时, MCF7 或 SW620 细胞以 50,000 个细胞 / 孔接种于 HGD MEM (含 4.5g/l 葡萄糖的高葡萄糖达氏修正伊氏培养基)+10% FBS、2mM L-谷氨酰胺中的 8 腔室培养玻片。将来自 MDA MB 231 细胞的 500u1 新鲜条件培养基加入含 MCF7 细胞的腔室。用 CM 孵育细胞 48-96 小时。来自 MCF7 或 SW620 细胞的条件培养基用作阴性对照。CM 孵育 48-96 小时后, 如上所述将细胞用罗丹明鬼笔环肽染色。

[0314] LOXL2 CM 处理的 SW620 细胞中 EMT 样变化需要 LOXL2 催化活性

[0315] 大鼠、猕猴和人 LOXL2 (野生型和 Y689F 突变体) 单独转染入 T175 瓶中的 HEK293 细胞, 根据生产商说明使用脂质体 2000 转染剂 (Lipofectamine 2000, 加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司)。转染后 4 小时吸出转染培养基并用 30ml DMEM+0.5% FBS 替换, 细胞在 37℃、5% CO₂ 生长 72 小时。收集条件培养基, 在 10,000MW 截止柱 (密理博公司) 中浓缩 ~ 10X 并经 0.2um 滤器 (Aerodisk 公司) 过滤。

[0316] 三维 I 型胶原凝胶

[0317] HFF 细胞以 2x 10⁵ 个细胞 / 孔的密度在 6 孔板内的 2mg/ml 或 3mg/ml I 型胶原凝胶中生长。Wozniak MA 和 Keely PJ (2005) Biological Procedures Online 7(1):144-161。简而言之, 用中和溶液 (含 100mM HEPES 的 PBS, pH 7.3) 混合 I 型胶原 (BD 生物科学公司 (BD Biosciences)) 且将含 10% FBS 和 2mM L-谷氨酰胺的 1ml RPMI (密迪亚泰克有限公司) 中的 HFF 细胞加入孔内。板在 37℃ 孵育 30 分钟, 然后加入 2ml / 孔的 RPMI/10% FBS/2mM 谷氨酰胺培养基。通过用小吸管端移动凝胶使一半凝胶浮于孔中, 另一半则保持附着。在第 4、7 和 8 天收集等分的条件培养基, 用 SDS-PAGE 凝胶解析, 通过印迹将凝胶中的蛋白质转至硝酸纤维素膜。用小鼠抗 LOXL2 单克隆抗体孵育膜, 然后用 HRP 偶联的山羊抗小鼠抗体 (GE 医疗保健公司) 孵育。用化学发光溶液 (阿尔法新技术公司 (AlphaInnotech)) 显现信号并用 UVP 成像分析。

[0318] 二维聚丙烯酰胺凝胶电泳

[0319] 如前所述 (Schlunck 等 2007) 浇注聚丙烯酰胺凝胶并置于 6 孔板中。细胞以 1x 10⁵ 个细胞 / 孔接种于 6 孔板并在不改变培养基的情况下培养 7-8 天。然后, 移除培养基以分析。然后, 裂解凝胶上的细胞以便蛋白质印迹 (“Western”) 分析或用 4% 多聚甲醛固定并用罗丹明鬼笔环肽 (英杰公司, 加利福尼亚州卡尔斯巴德) 根据生产商建议染色。

[0320] HFF 细胞中 siRNA 敲减 Lox 和 Loxl2

[0321] 用于抑制 LOXL2 表达的 siRNA 序列如下:

[0322] 5' -UAU GCU UUC CGG AAU CUC GAG GGU C-3' (SEQ ID NO:14) (双链寡核苷酸)

[0323] 5' -UGG AGU AAU CGG AUU CUG CAA CCU C-3' (SEQ ID NO:15) (双链寡核苷酸)

[0324] 5' -UCA ACG AAU UGU CAA AUU UGA ACC C-3' (SEQ ID NO:16) (双链寡核苷酸)

[0325] 用于抑制 LOX 表达的 siRNA 序列如下：

[0326] 5'-AUA ACA GCC AGG ACU CAA UCC CUG U-3' (SEQ ID NO:17) (双链寡核苷酸)

[0327] 将 60 微升的 20uM siRNA 混合入 1ml OptiMEM® (终 siRNA 为 100nM); 30ul Dharmafect 3 转染试剂 (美国热科学公司 (Thermo Scientific), 伊利诺伊州芝加哥) 混合入 1ml OptiMEM®。合并 2 种混合物并室温孵育 20 分钟。

[0328] 将 HFF 细胞在 10cm² 细胞培养板上培养, 直到其达到约 75% 融合度, 然后进行胰蛋白酶处理并重悬于 10ml 完全培养基。将 2ml 转染混合物 (如前段所述) 加到所述细胞, 所得混合物接种于 10cm² 培养皿。5 天后收获细胞培养物以测量蛋白水平。

[0329] 体外 HUVEC 实验

[0330] 将人类脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 接种于成纤维细胞饲养层并在 24 孔板内培养于 (龙沙公司 (Lonza)) 的 EBM-2 培养基 (开发用于低血清环境中正常人内皮细胞的基础培养基) 中的, 所述培养基补充有 hEGF、氢化可的松、GA-1000 (庆大霉素, 两性霉素-B)、FBS (胎牛血清) 10ml (最终 2%)、VEGF、hFGF-B、R3-IGF-1、抗坏血酸和肝素。细胞生长直到培养物显示处于血管形成的最早期阶段。在此时间点 (第 1 天), 将无添加物 (对照)、含抗 LOXL2 抗体 AB0023 或苏拉明的 0.5ml 新鲜内皮细胞生长培养基加入孔中。然后, 板在 37°C 和 5% CO₂ 培养。在第 4、7 和 9 天, 从所有孔中移除培养基并仔细换成含上面所列添加物的 0.5ml 新鲜培养基。在第 11 天, 固定板且如下测定小管的 CD31 表达。用 1ml PBS 清洗孔并用 1ml 冰冷 70% 乙醇室温固定 30 分钟。然后, 用 1:400 稀释在含 1% BSA 的 PBS 中的 0.5ml 小鼠抗人 CD31 抗体 37°C 孵育细胞 60 分钟。然后, 孔用 1ml PBS 清洗 3 次, 接着用 1:500 稀释在含 1% BSA 的 PBS 中的 0.5ml 碱性磷酸酶偶联山羊抗小鼠 IgG 二抗 37°C 孵育 60 分钟。孔再用 1ml PBS 清洗 3 次, 随后用 0.5ml 新鲜制备并过滤的 BCIP/NBT 底物 37°C 孵育 10 分钟。然后, 孔用 1ml 蒸馏水小心清洗 3 次, 空气干燥过夜。

[0331] 用尼康 Coolpix 相机在徕卡倒置显微镜上以 10x 放大拍摄各孔的数码图像。每孔成像 4 个随机视野, 共产生 96 个图像。然后, 图像转成 BMP 文档并输入图像分析包以测量血管分支数、血管数和血管总长。这些测量的进行通过图像阈值设定为仅检测 CD31 染色血管, 然后软件对之缩略以产生单一像素宽度血管, 从中能测量单独血管长度、血管总长和血管分支点数量。然后, 数据输出到 Excel 以计算各数据集的平均值和标准偏差。用一元方差分析 (one way ANOVA) 进行基本统计。

[0332] 实施例 7: 转移和原发性肿瘤发生的异种移植模型

[0333] 为提供生长肿瘤组织储液用于后续原位移植, 5-6 周龄裸鼠 (NCr nu/nu) 右侧胁部皮下注射 2x 10⁶ MDA-MB-435-GFP 细胞 (抗癌公司 (Anticancer, Inc.), 加利福尼亚州圣地亚哥)。为此目的, 收获 MDA-MB-435-GFP 细胞培养物并通过胰蛋白酶处理来解离, 用含血清的冷培养基清洗 3 次, 然后留于冰上直到注射。细胞在收获后 30 分钟内以 0.1ml 的总体积注入动物胁部皮下空间。在肿瘤细胞注射后 4-6 周杀死裸鼠以收获肿瘤组织用于手术原位移植 (SOT) 肿瘤片段。

[0334] 通过手术原位移植 (SOT) 将肿瘤小块 (~1mm³) 植入雌性裸鼠 (NCr nu/nu) 乳腺, 所述肿瘤小块提取自皮下生长的 GFP 表达乳腺肿瘤。当平均原发性肿瘤体积达到 75mm³ 时, 开始用 AB0023 (抗 LOXL2 单克隆抗体)、M64 (抗 LOX 单克隆抗体) 和载体 (全部经腹膜内注射) 以及多西他赛 (通过静脉内注射) 处理。给予小鼠 30mg/kg 剂量的抗体, 每周 2 次

持续 28 天,给予 10mg/kg 的多西他赛,每周 1 次持续 3 周。

[0335] 每周记录体重和肿瘤大小。研究结束时,在二氧化碳麻醉后通过颈脱位法杀死小鼠。原发性乳腺肿瘤经成像、收获、对称切半并速冻用于组织学和免疫组化分析。

[0336] 实施例 8 :CCl₄ 诱发的肝纤维化

[0337] 雄性 BALB/c 小鼠 (10-12 周龄) 获自阿拉贡生物科学公司 (Aragen Biosciences, 加利福尼亚州摩根希尔)。小鼠分成 4 组。3 组小鼠注射 CCl₄ (西格玛-奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich), 密苏里州圣路易斯), 剩余组的小鼠注射盐水。

[0338] CCl₄ 以 1ml/kg 体重 (1 : 1 (v/v) 比的 CCl₄ : 矿物油) 腹膜内给予小鼠,每周 2 次持续 4 周。对照组中,0.9% 盐水 (1 : 1 (v/v) 比的盐水 : 矿物油) 腹膜内给予小鼠,使用同一给药方案。

[0339] CCl₄ 处理组中,第一组用 AB0023 (稀释于 PBS/0.01% 吐温 -20) 处理,第二组用 pep4M64 (稀释于 10ml- 组氨酸缓冲液) 处理,第三组用载剂 (PBST) 处理。抗体和载剂以 30mg/kg 的剂量每周 2 次腹膜内注射。首次给予 CCl₄ 前一天开始处理并持续直到研究结束。给予 CCl₄ 和抗体 4 周后终止研究。给药完成后 96 小时对小鼠施以安乐死和人道处死并收获肝。速冻肝用于组织学和免疫组化分析。

[0340] 实施例 9 :体内基质胶 (Matrigel) 塞血管生成实验

[0341] 无胸腺雌性 NCr nu/nu 小鼠胁部皮下注射 0.5ml 的补充有 100ng/ml FGF 和 60U 肝素的高浓度基质胶 (BD 生物科学公司,加利福尼亚州圣何塞)。抗体处理开始后 1 周进行基质胶注射。通过腹膜内注射每周给予 2 次 30mg/kg 抗体 (或 PBST,作为对照)。在移植后 10 天通过切断胶栓与所附皮肤而收获基质胶栓,用 10% 中性缓冲福尔马林固定并石蜡包埋。切下 5um 切片,用苏木精与伊红、抗 CD31 或抗 CD34 抗体染色以评价血管形成的程度。

[0342] 实施例 10 :免疫组化

[0343] 除非另有说明,免疫组化 (IHC) 操作所用溶液获自保科医学公司 (Biocare Medical,加利福尼亚州康科德)。所有过程室温进行。玻片用 4% PFA 固定 10 分钟,随后用 Peroxidized-1 (保科医学公司,加利福尼亚州康科德) 处理 5 分钟。然后,玻片用 SNIPER (保科医学公司,加利福尼亚州康科德) 封闭背景 10 分钟。一抗 (2-5ug/ml 终浓度) 用达芬奇绿色通用稀释剂 (Da Vinci Green Universal Diluent) 稀释并施用于玻片 30 分钟。然后玻片在 PBS- 吐温 -20 中淋洗。用 Mach2 聚合物试剂盒通过加入兔探针用时 30 分钟检测抗原。将 DAB 发色团加至玻片 3-5 分钟,然后用去离子水淋洗玻片 1 次。然后用苏木精复染玻片,接着用梯度乙醇脱水。用 entellan 封片胶 (电子显微镜科学公司 (Electron Microscopy Sciences),宾夕法尼亚州海特菲尔德) 封固玻片。

[0344] 实施例 11 :IHC 图像的定量分析

[0345] 肝纤维化

[0346] 各处理方案随机选择 10 个视野 (或区或叶) 且用天狼星红染色。用于评分的区域为 1.7mm x 1.3mm 并含有至少 8 个门三联管。

[0347] 计数完全桥接纤维化的三联管和区。将完全桥接纤维化区的数量除以三联管区的总数,从各场获得完全桥接纤维化百分数。对 10 个视野的百分数 (每种处理) 取平均值并计算标准误差。

[0348] 通过染色 aSMA 表达分析成纤维细胞激活

[0349] 对于各处理,选择 5 个视野且用抗 α 平滑肌肌动蛋白 (aSMA) 抗体染色。由 Metamorph(分子设备公司 (Molecular Devices), 宾夕法尼亚州唐宁顿) 分析肝门区的 aSMA 阳性信号 (阈值面积%)。比较进行 AB0023 处理动物的切片中的 aSMA 阳性信号与载体 (PBS) 处理动物的切片所得信号。

[0350] 实施例 12 :RT-PCR 分析

[0351] 总 RNA 分离和定量实时 PCR

[0352] 用 RNeasy Mini 试剂盒 (凯杰公司,加利福尼亚州瓦伦西亚) 根据生产商说明从冷冻组织块中提取 RNA。简而言之,用 Polytron 手持式电动均质器将组织在 RLT 裂解缓冲液中均质化,用无核酸酶的水 (安碧公司 (Ambion), 德克萨斯州奥斯汀) 洗脱。用重组 DNA 酶 I (安碧公司, 德克萨斯州奥斯汀) 去除剩余的基因组 DNA 污染。用 100 纳克总 RNA/ 反应进行逆转录酶介导的 cDNA 合成,随后用 BrilliantII qPCR 一步核心试剂盒 (安捷伦公司 (Agilent), 加利福尼亚州圣克拉拉) 进行 PCR。反应一式两份在 Mx3000P 仪器 (安捷伦公司, 加利福尼亚州圣克拉拉) 中进行。通过实时 PCR (TaqMan®) 分析基因表达,使用由 Beacon Designer 软件针对人 (h) 和小鼠 (m) 设计的物种特异性引物和探针组:

[0353] hLOX :

[0354] 正向 5' CTTGACTGGGGAAGGGTCTG 3' (SEQ ID NO :18),

[0355] 反向 5' AAAACGGGGCTCAAATCACG 3' (SEQ ID NO :19),

[0356] 探针 5' ATCCCACCCTTGGCATTGCTTGGT 3' (SEQ ID NO :20)

[0357] hLOXL1 :

[0358] 正向 5' AGCAGACTTCCTCCCCAACC 3' (SEQ ID NO :21),

[0359] 反向 5' CAGTAGGTCGTAGTGGCTGAAC 3' (SEQ ID NO :22)

[0360] 探针 5' CACGGCACACCTGGGAGTGGCAC 3' (SEQ ID NO :23)

[0361] hLOXL2 :

[0362] 正向 5' GGGGTTTGTCCACAGAGCTG 3' (SEQ ID NO :24),

[0363] 反向 5' ACGTGTCAGTGGAGAAGAGC 3' (SEQ ID NO :25),

[0364] 探针 5' TGGAGCAGCACCAAGAGCCAGTCT 3' (SEQ ID NO :26)

[0365] hLOXL3 :

[0366] 正向 5' GTGTGCGACAAAGGCTGGAG 3' (SEQ ID NO :27),

[0367] 反向 5' CCGCGTTGACCCTCTTTTCG 3' (SEQ ID NO :28),

[0368] 探针 5' AAGCCCAGCATCCCGCAGACCAC 3' (SEQ ID NO :29)

[0369] hLOXL4 :

[0370] 正向 5' CTTACCACACACATGGGTGTTTC 3' (SEQ ID NO :30),

[0371] 反向 5' TCAAGCACTCCGTAAGTGTGG 3' (SEQ ID NO :31),

[0372] 探针 5' CCTTGAAGCACAGACCTCGGGCA 3' (SEQ ID NO :32)

[0373] hACTA2 : (α 平滑肌肌动蛋白)

[0374] 正向 5' CTATCCAGGCGGTGCTGTC 3' (SEQ ID NO :33),

[0375] 反向 5' ATGATGGCATGGGGCAAGG 3' (SEQ ID NO :34),

[0376] 探针 5' CCTCTGGACGCACAACTGGCATCG 3' (SEQ ID NO :35)

- [0377] hFN1:(纤连蛋白)
- [0378] 正向 5' TGGGAGTTTCCTGAGGGTTTTC 3' (SEQ ID NO :36),
- [0379] 反向 5' GCATCTTGGTTGGCTGCATATG 3' (SEQ ID NO :37),
- [0380] 探针 5' AGGGCTGCACATTGCCTGTTCTGC 3' (SEQ ID NO :38)
- [0381] hVIM:(波形蛋白)
- [0382] 正向 5' CAGGCAAAGCAGGAGTCCAC 3' (SEQ ID NO :39),
- [0383] 反向 5' CTTCAACGGCAAAGTTCTCTTCC 3' (SEQ ID NO :40),
- [0384] 探针 5' ACCGGAGACAGGTGCAGTCCCTCA 3' (SEQ ID NO :41)
- [0385] hSNAI1:(Snail)
- [0386] 正向 5' TCAAGATGCACATCCGAAGCC 3' (SEQ ID NO :42),
- [0387] 反向 5' CAGTGGGGACAGGAGAAGGG 3' (SEQ ID NO :43),
- [0388] 探针 5' CCTGCGTCTGCGGAACCTGCGG 3' (SEQ ID NO :44)
- [0389] hCOL1A1:(I 型胶原)
- [0390] 正向 5' ACAGAACGGCCTCAGGTACC 3' (SEQ ID NO :45),
- [0391] 反向 5' TTCTTGGTCTCGTCACAGATCAC 3' (SEQ ID NO :46),
- [0392] 探针 5' CGTGTGGAAACCCGAGCCCTGCC 3' (SEQ ID NO :47)
- [0393] hRPL19:(核糖体蛋白 L19)
- [0394] 正向 5' CCGGCTGCTCAGAAGATAC 3' (SEQ ID NO :48),
- [0395] 反向 5' TTCAGGTACAGGCTGTGATACAT 3' (SEQ ID NO :49),
- [0396] 探针 5' TGGCGATCGATCTTCTTAGATTACG 3' (SEQ ID NO :50)
- [0397] mLOX :
- [0398] 正向 5' CAAGAGGGAAGCAGAGCCTTC 3' (SEQ ID NO :51),
- [0399] 反向 5' GCACCTTCTGAATGTAAGAGTCTC 3' (SEQ ID NO :52),
- [0400] 探针 5' ACCAAGGAGCACGCACCACAACGA 3' (SEQ ID NO :53)
- [0401] mLOXL1 :
- [0402] 正向 5' GGCCTTCGCCACCACCTATC 3' (SEQ ID NO :54),
- [0403] 反向 5' GTAGTACACGTAGCCCTGTTCG 3' (SEQ ID NO :55),
- [0404] 探针 5' CCAGCCATCCTCCTACCCGCAGCA 3' (SEQ ID NO :56)
- [0405] mLOXL2 :
- [0406] 正向 5' GCTATGTAGAGGCCAAGTCCTG 3' (SEQ ID NO :57),
- [0407] 反向 5' CAGTGACACCCCAGCCATTG 3' (SEQ ID NO :58),
- [0408] 探针 5' TCCTCCTACGGTCCAGGCGAAGGC 3' (SEQ ID NO :59)
- [0409] mLOXL3 :
- [0410] 正向 5' AACGGCAAGCTGTCTGGAAG 3' (SEQ ID NO :60),
- [0411] 反向 5' AGCCAACATTGACCTAGCACTG 3' (SEQ ID NO :61),
- [0412] 探针 5' TCCCGCCCATTCCCACCCATCTCG 3' (SEQ ID NO :62)
- [0413] mLOXL4 :
- [0414] 正向 5' CAAGACAGGTCCAGTAGAGTTAGG 3' (SEQ ID NO :63),
- [0415] 反向 5' AGGTCTTATACCACCTGAGCAAG 3' (SEQ ID NO :64),

- [0416] 探针 5' ACAGAGCACAGCCGCTCACTGGA 3' (SEQ ID NO :65)
- [0417] mACTA2 : (α 平滑肌肌动蛋白)
- [0418] 正向 5' TCTGCCTCTAGCACACAACCTG 3' (SEQ ID NO :66),
- [0419] 反向 5' AAACCACGAGTAACAAATCAAAGC 3' (SEQ ID NO :67),
- [0420] 探针 5' TGTGGATCAGCGCTCCAGTTCCT 3' (SEQ ID NO :68)
- [0421] mFN1 : (纤连蛋白)
- [0422] 正向 5' CACCTCTGCTTTCTTTTGCCATC 3' (SEQ ID NO :69),
- [0423] 反向 5' CTGTGGGAGGGGTGTTGAAC 3' (SEQ ID NO :70),
- [0424] 探针 5' TGCAGCACTGTCAGGACATGGCCT 3' (SEQ ID NO :71)
- [0425] mVIM : (波形蛋白)
- [0426] 正向 5' CGCCCTCATTCCCTTGTTC 3' (SEQ ID NO :72),
- [0427] 反向 5' GGAGGACGAGGACACAGACC 3' (SEQ ID NO :73),
- [0428] 探针 5' TTCCAGCCGAGCAAGCCAGCC 3' (SEQ ID NO :74)
- [0429] mCOL1A1 : (I 型胶原)
- [0430] 正向 5' CGGCTGTGTGCGATGACG 3' (SEQ ID NO :75),
- [0431] 反向 5' ACGTATTCTTCCGGCAGAAAG 3' (SEQ ID NO :76),
- [0432] 探针 5' CAGCACTCGCCCTCCCGTCTTTGG 3' (SEQ ID NO :77)
- [0433] mRPL19 : (核糖体蛋白 L19)
- [0434] 正向 5' AGAAGGTGACCTGGATGAGAA 3' (SEQ ID NO :78),
- [0435] 反向 5' TGATACATATGGCGGTCAATCT 3' (SEQ ID NO :79),
- [0436] 探针 5' CTTCTCAGGAGATACCGGGAATCCAAG 3' (SEQ ID NO :80)
- [0437] 通过肿瘤与正常样品间阈值循环 (Ct) 的差异计算转录物水平的平均变化倍数。各表达水平根据 RPL19 基因的表达水平归一化。
- [0438] 实施例 13 : LOXL2 在多种肿瘤间质和肝纤维化病理细胞中高表达
- [0439] 肿瘤中的 LOXL2 转录物分析显示大部分主要实体肿瘤中的表达高于非肿瘤组织 (小结于图 1 的 A 小图)。在一些肿瘤类型中, LOXL2 转录物显示出随着分期或分级的提高而增加表达的趋势 (如结肠癌、胰腺癌、子宫癌、肾细胞癌、胃癌和头颈癌, 图 7 的 A、B、C、D、E、F 小图; III 级肺腺癌中转录物也提高 (未显示))。通过免疫组化进一步研究 LOXL2 蛋白在肿瘤中的分布和定位, 使用 LOXL2 特异性多克隆抗体 (图 7 的 G 小图) 和经少处理的新鲜冷冻组织。除一些胞质信号外, LOXL2 在肿瘤中大量分泌且通常与胶原基质区相关联 (图 1 的 B、C、D、E、F 小图; 图 7 的 H、I、J、K、M、O 小图)。在多种实体肿瘤中观察到类似的表达模式, 具有间质成纤维细胞和脉管系统以及一些肿瘤细胞区域的 LOXL2 表达 (图 1 的 C、E、F、G、H、I、J; 图 7 的 H-O 小图)。图 1 的 k 小图显示 LOX 表达。表达 LOXL2 的间质成纤维细胞是 α SMA 阳性 (未显示)。在活动性疾病界面如肿瘤 - 间质边界检测到显著的分泌 LOXL2 信号 (图 1 的 E、F、G 小图; 图 7 的 H 小图), 强 LOXL2 信号与指示肿瘤相关血管生成的血管球微血管结构相关联 (图 1 的 F、I 小图)。LOXL2 还在高度血管生成性肿瘤如透明细胞性肾细胞癌中高表达 (图 1 的 L 小图)。相比之下, 在大部分非肿瘤组织和主要器官如心、肝和肺中检测到极少 LOXL2 蛋白 (图 7 的 P、R、S; 小结于图 7 的表 1)。与先前报道一致, 在生殖器官如卵巢和子宫中观察到一些信号, 以及在脾的网状纤维 (示例于图 7 的

U、V 小图中)和一些非肿瘤性肾区域也观察到。尽管 LOXL2 在肿瘤相关脉管系统中有高表达,但在健康组织脉管系统中检测到极少 LOXL2 表达(图 7 的 P、Q、S、T 小图)。差异性表达、分泌和与活动性疾病的关联支持在肿瘤学中靶向 LOXL2。尽管先前已报道了肿瘤细胞的 LOXL2 表达(主要是胞质),此分析显示肿瘤相关间质细胞如 TAF 和新生血管的广泛表达。此 LOXL2 定位模式在不同来源的实体肿瘤中保守。

[0440] 相比之下,对肿瘤组织中 LOX 蛋白测得的主要定位模式是成纤维细胞和内皮细胞以及一些肿瘤细胞的胞质染色,分泌的迹象较少且与肿瘤中胶原基质的关联较少。此表达模式也在不同肿瘤类型中保守(图 1 的 K 小图,图 7 的 L、N 小图)。与 LOXL2 相反,在正常组织如动脉和血管及非血管平滑肌中检测到高水平 LOX 蛋白(图 7 的 W、X、Y、Z 小图)。动脉中显著的 LOX 表达与将牛主动脉描述为经切割酶活性 LOX 蛋白主要来源的文献报道一致。

[0441] 还评估纤维化肝中的 LOXL2 和 LOX 表达。LOXL2 在疾病界面高表达和分泌,所述疾病界面由成纤维细胞、肝细胞、血管和炎性细胞构成(图 1 的 M、N、O 小图)。也检测到 LOX 蛋白,但在成纤维细胞中主要是胞质细胞定位(图 1 的 P 小图)。尽管这些疾病的病因不同,但在肿瘤和活性纤维化肝中都观察到类似的 LOX 和 LOXL2 表达和定位模式。

[0442] 实施例 14:分泌的 LOXL2 在体外促进肿瘤细胞的重构和侵袭

[0443] 常氧条件下许多不同肿瘤细胞系表达 LOXL2(图 8 的 A、B 小图)。在条件培养基中检测到 LOXL2 蛋白的全长(~80kDa)和切割蛋白(~55kDa)。与先前的报道相反,对纯化 LOXL2 蛋白的分析显示这两种 LOXL2 形式在体外都具有酶活性且为 BAPN 抑制(图 8 的 C、D 小图)。使用免疫荧光和 LOXL2 特异性单克隆抗体(AB0023)表明 LOXL2 与其底物 I 型胶原共定位于肿瘤细胞的胞外基质,与肿瘤组织所得结果一致(图 2 的 A、B 小图;图 8 的 E、F、G 小图)。相比之下,尽管在来自成骨细胞细胞系的条件培养基中存在分泌的加工 LOX(图 8 的 H 小图),在分离自常氧或低氧条件下肿瘤细胞系或者成纤维细胞的条件下培养基中未重复检测到 LOX(图 8 的 I、J 小图),但在细胞团部分中发现。

[0444] 已描述 LOXL2 在上皮-间质转换(EMT)中通过与 EMT 相关转录因子 SNAIL 直接相互作用而发挥作用。在表达所有 5 种赖氨酰氧化酶型酶的乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中通过用 shRNA 敲减 LOXL2 去除 LOXL2,导致肌动蛋白细胞骨架重构以产生具有肌动蛋白应力纤维关联减少的更上皮化表型(由鬼笔环肽染色呈现,图 8 的 K、L 小图)。然而,未观察到 LOXL2 抑制引起完全间质-上皮转换(MET)样变化,因为细胞对 E-钙粘蛋白仍保持阴性。

[0445] 我们通过用来自 MDA-MB231 或 Hs-578t 肿瘤细胞、含外源分泌 LOXL2 的条件培养基处理 MCF7 细胞(其在常氧条件下表达少量 LOXL2),研究了胞外 LOXL2 在重构肿瘤细胞的作用。用 IgG 对照抗体或抑制性 LOXL2 单克隆抗体 AB0023 处理条件所述培养基。AB0023 结合 LOXL2 的 SRCR3-4 区,证明与其它赖氨酰氧化酶型酶没有交叉反应性(图 8 的 M、N 小图),且抑制 LOXL2 的赖氨酰氧化酶活性(图 8 的 O 小图)。AB0023 以类似亲和性结合人和小鼠 LOXL2(图 8 的 P 小图)。含 LOXL2 的条件培养基诱发肌动蛋白细胞骨架重构,引起细胞形态拉长且肌动蛋白应力纤维增加,此重构通过加入 AB0023 来消除(图 2 的 C、D、E、F 小图)。然而,用 BAPN 预孵育条件培养基不抑制此表型变化,即使是用高浓度(2mM,数据未显示)。单用纯化、酶活性 LOXL2 不能诱发细胞重构,表明细胞分泌的 LOXL2 与其它蛋白协同诱发这些变化。为进一步研究分泌 LOXL2 引起表型重构所需的结构域,表达该蛋白的截

短和突变形式并评估其诱发此变化的能力,包括 N 末端 SRCR 结构域和分泌但没有酶活性的 LOXL2 变体,所述变体通过突变酶结构域中 LTQ 形成所需的赖氨酸残基而产生。在条件培养基中表达时,单独 SRCR 结构域(数据未显示)和无酶活性的 LOXL2 都不能诱发重构(图 8 的 Q、R、S、T 小图),表明此过程既需要酶结构域也需要酶活性。总之,这些数据支持分泌、有酶活性的 LOXL2 在肿瘤细胞肌动蛋白细胞骨架趋向更间质化表型的重构中的作用。

[0446] 实施例 15:LOXL2 在体外和体内促进成纤维细胞激活

[0447] 为研究成纤维细胞对 LOXL2 分泌的调节,使用包被有胶原基质的双丙烯酰胺交联凝胶和漂浮或附着的胶原凝胶,建立可变张力的体外模型。低张力(0.2%双丙烯酰胺和漂浮胶原凝胶)时,胞内检测到 LOXL2 蛋白,条件培养基中的分泌蛋白很有限。较高张力(0.8%双丙烯酰胺、附着胶原凝胶和标准组织培养板)时,成纤维细胞大量分泌 LOXL2(图 3 的 A 小图,图 9 的 A 小图)。这些数据表明可通过局部张力变化(例如,与炎症或基质生成或交联相关)诱导 LOXL2 分泌。在 0.2 或 0.8%双丙烯酰胺胶原凝胶或者漂浮或附着胶原凝胶上生长的 HFF 细胞中都未检测到显著水平的分泌 LOX,但仅对于在经组织培养处理的塑料制品上生长的 HFF 细胞。

[0448] 考虑到人肿瘤中 TAF 的 LOXL2 高表达和 LOXL2 对肿瘤细胞重构的影响,用 siRNA 敲减检测 LOXL2 对成纤维细胞形态的作用。消除 HFF 中的 LOXL2 导致胞间构造比对照转染细胞减少。siLOXL2 细胞仍分泌 I 型胶原,但该胶原排列紊乱且缺失对照转染细胞中明显的纤维结构组成(图 3 的 B、C 小图;图 9 的 B 小图)。用鬼笔环肽染色 siLOXL2 敲减细胞显示肌动蛋白细胞骨架的巨大变化:细胞不太拉长而是更圆,中央或周边肌动蛋白应力纤维减少(图 3 的 D、E 小图)。与此表型变化一致,在低张力条件(0.2%双丙烯酰胺)下生长的分泌较少 LOXL2 的成纤维细胞显现更圆、肌动蛋白应力纤维减少的上皮样结构,而在较高张力(0.8%双丙烯酰胺)下生长的分泌显著更多 LOXL2 的细胞呈现更细长、成纤维细胞样表型(图 3 的 F、G 小图)。这些发现支持 LOXL2 通过胶原胞外基质在维持活化成纤维细胞形态和胞内构造中起作用。

[0449] 对 LOXL2 参与成纤维细胞激活、纤维化和结缔组织形成相关途径进行检测。存在或缺失 AB0023 情况下,在成纤维细胞或肿瘤细胞系中用 PDGF-BB 处理细胞后的 10-60 分钟时间段没有观察到对 AKT 磷酸化的显著影响(未显示)。TGFb 信号传递的研究证实 AB0023 在 10-60 分钟时间框内中度抑制(约 10-20%)SMAD2 磷酸化。然而,用来自肿瘤细胞系的含 LOXL2 的条件培养基通过微孔膜共培养更长一段时间来处理 HFF 细胞后,显现更强烈的影响。72 小时后,存在 AB0023 的共培养引起 pSMAD2 磷酸化相对减少 56-94%(图 3, H、I 小图)。还观察到 α -SMA 水平降低 41%。对肿瘤相关成纤维细胞特征性的 VEGF 蛋白表达的评估显示存在 AB0023 时减少 39-46%。总之,这些数据表明 LOXL2 不通过直接强化生长因子推动的信号途径起作用,因为在短孵育时间内进行的实验中可预期更显著的影响。相反,这些结果可能表明 LOXL2 可通过其对胞外基质的活性来介导 TGFb 信号传递和相关成纤维细胞活性。显示张力增加可诱导胞外基质中潜在复合体的 TGFb 信号传递激活。因此,这些发现与通过胞外基质中 LOXL2 诱发变化来调节信号传递相一致,直接或可能经整合蛋白介导的交联纤维胶原感应。

[0450] 通过比较稳定转染有编码 LOXL2 表达载体的 MCF7 细胞(MCF7-LOXL2)与 MCF7 对照细胞的肿瘤形成在体内评估 LOXL2 表达的结果。转染细胞体外增殖率低于 MCF7-对照细

胞观察到的增殖率。然而, nu/nu 小鼠肾被膜中产生肿瘤后, MCF7-LOXL2 细胞比对照 MCF7 细胞产生更大的肿瘤(体积增加 3.5X)(图 3 的 J 小图)。用带小鼠特异性引物的 qRT-PCR 对这些肿瘤间质组分的分析表明, 与对照相比, MCF7-LOXL2 细胞诱导间质激活, α SMA、I 型胶原、波形蛋白、MMP9 和纤连蛋白的转录物增加(图 3 的 K 小图)。这些结果支持 LOXL2 在体内激活和重构肿瘤关联间质中的作用。

[0451] 总之, 这些结果提示破坏 LOXL2 可扰动细胞和其环境间的相互作用, 这可能是通过破坏胶原/基质介导的信号传递, 导致肌动蛋白细胞骨架的胞内构造和成纤维细胞的胞间构造受到破坏。这些数据还表明 LOXL2 可在维持更高活化状态中发挥自身刺激作用, 并因而对进行中的疾病相关成纤维细胞如 TAF 和肌成纤维细胞的激活很重要。

[0452] 实施例 16 : 抗 LOXL2 抗体 AB0023 在体外和体内抑制血管生成

[0453] 分析人肿瘤显示血管球血管和其它新生血管的内皮细胞显著表达 LOXL2。已知 LOXL2 由培养的原代内皮细胞表达并描述为对此情况中的血管弹性组织生成很重要。用 siRNA 敲减消除 HUVEC 细胞的 LOXL2 并检测形态变化。与对照转染细胞相比, siLOXL2 HUVEC 细胞显示肌动蛋白应力纤维减少(图 4 的 A、B 小图), 与上述 LOXL2 对成纤维细胞和肿瘤细胞的影响类似。

[0454] 为进一步评价分泌 LOXL2 的作用, 采用体外 HUVEC 血管形成实验研究抗 LOXL2 抗体 AB0023 抑制血管生成的能力。AB0023 以剂量依赖性方式抑制血管分支、血管长度和所形成血管的总数, 在 50ug/ml 完全抑制所有过程(图 4 的 C、D、E、F、G、H、I 小图)。AB0023 抑制这些过程的 IC₅₀ 计算值(图 4 的 G、H、I 小图; 分别为 22.2nM、19.9nM、33.2nM) 与体外就 AB0023 抑制纯化 LOXL2 酶活性观察到的表现 IC₅₀ 一致(~30nM)。

[0455] 用含 bFGF 的基质胶栓评价 AB0023 体内抑制血管生成的能力, 所述胶栓插入 Balb/C 小鼠胁部。分离自载剂处理动物的胶栓含有由 CD31 阳性细胞构成的脉管系统侵袭和分支的迹象(图 4 的 J、L 小图), 而分离自经 AB0023 腹膜内注射处理动物的胶栓显示有限的脉管系统迹象, CD31 阳性细胞少很多(图 4 的 K、M 小图)。通过 IHC 确认浸润内皮细胞的 LOXL2 表达(图 10 的 A、B 小图)。定量分析单独胶栓的血管平均数, 得到 AB0023 处理动物减少~7 倍($p = 0.0319$; 图 4 的 N 小图)。定量基质胶栓中 CD31 阳性细胞的另一分析还显示 AB0023 处理动物中减少显著($p = 0.0168$; 图 4 的 O 小图)。这些结果表明分泌的 LOXL2 在血管生成的多个方面发挥重要作用, 血管生成在体外和体内都直接受到 AB0023 抑制。

[0456] 实施例 17 : 抑制 LOXL2 在原发性肿瘤和癌的转移性异种移植模型中提供体内治疗益处

[0457] 在弥散型骨转移模型中评价抑制 LOXL2 或 LOX 的治疗结果。采用靶向 LOXL2 或 LOX 的特异性抗体处理小鼠, 所述小鼠的左心室注射~100 万个带标记的 MDA-MB-231 细胞。乳腺肿瘤细胞系 MDA-MB-231 广泛用作研究 LOX 的模型, 其表达所有 5 种赖氨酰氧化酶型酶(图 11 的 A 小图)。将 LOXL2 抑制性抗体 AB0023 减少肿瘤负荷的能力与 LOX 特异性抗体 M64 作比较, M64 是靶向与上述产生抑制性多克隆抗血清的 LOX 酶结构域中同一肽序列的单克隆抗体。28 天后, 抗 LOXL2 AB0023 处理肿瘤中观察到的股骨和总腹部骨的肿瘤细胞负荷显著减少(股骨中值减少 127 倍, $p = 0.0021$; 总腹部骨中值减少 28 倍, $p = 0.0197$; 图 5 的 A、B 小图), 但在抗 LOX 抗体 M64 处理肿瘤中未见减少(分别为 $p = 0.5262$ 和 0.5153 ;

图 5 的 A、B 小图 ;还采用高剂量多西他赛 (20mg/kg) 作为阳性对照)。在另一研究中,在联用每周 2 次 30mg/kg AB0023 与每周 1 次 5mg/kg 紫杉醇 (Paclitaxel) 处理的动物中观察到显著的存活益处 ($p = 0.025$)。

[0458] 我们对人肿瘤的分析显示不同癌症的间质细胞有此前尚未认识到的强 LOXL2 表达。原发性肿瘤生成的异种移植模型通常不是对于肿瘤微环境和人肿瘤中明显的结缔组织形成的好模型,因此评估许多不同细胞系以鉴定产生代表人肿瘤中 LOXL2 表达的肿瘤形成的模型。选择 MDA-MB-435 作为分析抗 LOXL2 抗体 AB0023 的原发性肿瘤模型,因为这些细胞形成的肿瘤产生结缔组织形成反应并与人肿瘤在 LOXL2 定位方面具有相似性,在肿瘤-间质界面和胶原基质上有分泌的 LOXL2 蛋白;并与由成纤维细胞、血管和一些肿瘤细胞表达的 LOXL2 有相似性(图 5 的 C 小图)。MDA-MB-435- 产生肿瘤中的 LOX 定位也与人肿瘤中检测到的模式一致,胞质染色成纤维细胞、肿瘤细胞亚组和血管,有证据显示与所述基质关联的分泌 LOX(图 5 的 D 小图)。

[0459] 肿瘤初始在 nu/nu 小鼠胁部增殖,然后植入哺乳动物脂肪垫并使其建立。用抗 LOXL2 AB0023 处理已建立的原发性肿瘤,肿瘤体积在 3 周内减小 45% ($p = 0.001$)。用抗 LOX M64 中也观察到较弱的抑制,肿瘤体积减小 27% ($p = 0.04$)。所述研究再延长 2 周可产生持续的肿瘤生长。然而,用 AB0023 处理可使肿瘤体积保持统计上的显著减小 ($p = 0.024$, 体积减小 33%;图 5 的 E 小图),但用抗 LOX 抗体 M64 处理则不能。总之,这些结果表明抗 LOXL2 AB0023 在 5 周内有效减少已建立原发性肿瘤的肿瘤负荷。

[0460] 实施例 18 :抑制 LOXL2 显著减少间质激活且抑制肿瘤微环境产生

[0461] 为进一步研究抗 LOXL2 AB0023 减小原发性肿瘤体积的机制,在 MDA-MB-435 所建立原发性肿瘤的研究中,于第 39 天从载剂处理对照以及抗 LOXL2 AB0023 处理、抗 LOX M64 处理、和多西他赛处理组中收获涵盖匹配范围的相对尺寸的肿瘤。对肿瘤进行切片用于组织学和免疫组化,用各种特异性细胞标记的抗体进行分析。令人惊讶的是,AB0023 所处理肿瘤的组成不同于所有其它组,包括分离自高剂量多西他赛所处理动物(正对照组)的很小肿瘤,后者尽管尺寸小但在组成上与大许多的载剂处理肿瘤类似。AB0023 处理的肿瘤缺乏许多重要的肿瘤微环境特征。具体地,天狼星红染色减少 61%证实胶原基质或结缔组织形成显著减少 ($p = 0.0027$;图 5 的 G、N 小图)。与此相关,SMA 信号评价存在活化 TAF 时的减少为 88% (图 5 的 K、N 小图)。在抗 LOX M64 或多西他赛处理的肿瘤中这些标记都未见显著差异(图 5 的 F-N 小图)。在抗 LOXL2 AB0023 处理的肿瘤中肿瘤脉管系统也显著减少(CD31 信号减少 74%, $p = 0.0002$;图 5 的 N 小图)。尽管效率较低,多西他赛处理也减少相对肿瘤脉管系统(CD31 信号减少 43%, $p = 0.023$;图 5 的 N 小图),与先前的报道一致(图 5 的 N 小图;图 11 的 B、C、D、E 小图)。

[0462] 在使用 MDA-MB-435 原发性肿瘤模型的独立研究中,直接比较 AB0023 (5mg/kg, 每周 2 次)与 BAPN(每日 100mg/kg)。46 天后,AB0023 处理的动物中观察到肿瘤体积有类似减小 (38.4%; $p = 0.04$;图 5 的 O 小图)。相比之下,每日用 BAPN 处理的小鼠中观察到肿瘤体积减小 19% (统计上不显著)(图 5 的 O 小图)。重要的是,对这些肿瘤的间质和基质的分析显示 AB0023 在抑制间质激活和产生肿瘤基本结构上明显更有效。根据天狼星红染色评价,AB0023 处理再次引起胶原生成减少 (47%减少, $p = 0.0193$),并且按 α SMA 阳性测定大幅降低了成纤维细胞激活 (> 90%减少, $p = 0.0161$),与第一研究类似,而用 BAPN

处理的肿瘤含有结缔组织增生性基质和活化成纤维细胞,与载剂处理的对照类似(图5的P小图)。脉管系统形成再次在AB0023处理的肿瘤中受到显著抑制(CD31信号减少52%, $p = 0.0307$),而BAPN处理不引起肿瘤脉管系统减少(图5的P小图)。总之,这些结果确认了AB0023在抑制LOXL2介导的肿瘤微环境产生上的有效性。相比之下,泛LOX/L抑制剂BAPN对抑制成纤维细胞激活、结缔组织形成或血管生成无效。

[0463] 考虑到激活的肿瘤相关成纤维细胞在通过血管生成、脉管发生和其它过程促进肿瘤生长中显现的重要作用,以及在抗LOXL2 AB0023处理肿瘤中活化成纤维细胞的大幅减少,研究了AB0023处理对表达肿瘤发生的其它相关重要因子的影响。TAF引起肿瘤中显著的VEGF生成,人肿瘤中LOXL2和VEGF表达模式的相似性在于TAF关联表达(图11的F、G小图)。分析MDA-MB-435肿瘤显示AB0023处理肿瘤中的VEGF信号比载剂处理肿瘤减少76%($p = 0.0001$;图5的Q小图)。对TAF表达的促血管生成和促肿瘤生成细胞因子SDF-1/CXCL12的分析显示相似的信号减少(80%, $p = 0.0205$;图5的Q小图)。AB0023所处理动物的组织中结缔组织生长因子(CTGF)的水平也有降低。在AB0023处理的肿瘤中LOXL2信号本身减少55%($p = 0.0005$)(图5的Q小图;图11的H、I、J、K、L、M小图)。用抗LOX抗体处理的动物中未见这些生长因子水平或LOXL2水平的降低。

[0464] 采用基于组织的ELISA测量转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)和TGF- β 信号传递下游标记磷酸化SMAD2(P-SMAD2)的水平。在AB0023所处理动物的成纤维细胞和肿瘤细胞中这两种蛋白的水平都有减少。在抗LOX处理的动物或未接受抗体的对照中没有观察到相当的减少。这些结果表明抑制LOXL2会阻断肿瘤组织中的TGF- β 信号途径,导致肿瘤生长变缓和/或肿瘤细胞死亡。

[0465] 用H&E染色和其它标记分析肿瘤显示AB0023处理的肿瘤中存在成纤维细胞,尽管总体丰度低于载剂处理的对照(图11的N、O小图)。这表明除成纤维细胞激活外,进行的成纤维细胞募集也可能受到抗LOXL2处理影响。总之,这些数据显示AB0023抑制LOXL2会引起TAF激活和成纤维细胞募集的显著减少,关键的血管生成性、脉管发生性和肿瘤关联性因子如VEGF、SDF-1以及LOXL2本身的水平相应地显著降低。

[0466] AB0023所处理肿瘤中的肿瘤细胞还显示不同于载剂处理的肿瘤细胞。AB0023处理组中的许多肿瘤含有明显坏死区域(图5的R、S小图),而其它处理组中坏死很少。此外,AB0023处理的肿瘤呈现存活性降低的其它迹象,核的固缩和胞质浓缩增加与早期肿瘤坏死一致,相比之下载剂处理的肿瘤中核完整(图5的T、U小图)。自噬相关蛋白Beclin-1的水平在来自AB0023处理动物和多西他赛处理动物的肿瘤细胞中有增加,但在抗LOX抗体处理动物或载剂对照的肿瘤细胞中不增加。这些结果与AB0023处理动物的肿瘤细胞由于除去TAF分泌的生长因子而经历坏死和II型自噬性细胞死亡的想法一致,如上所述在AB0023处理动物中TAF的数量有减少。这些分析显示AB0023抑制LOXL2在降低肿瘤负荷和建立肿瘤微环境方面比抗LOX抗体M64或泛LOX/L抑制剂BAPN明显更有效。用特异性单克隆抗体抑制LOXL2提供了新治疗策略的示例,所述策略靶向遗传上比肿瘤细胞更稳定的间质微环境。间质LOXL2表达模式在多种肿瘤间的保守性表明LOXL2抑制剂用于癌症治疗的广泛适用性。抑制LOXL2活性的结果超出肿瘤基本结构的改变,还包括对TAF生成生长因子、促血管生成蛋白和促血管发生蛋白的影响。因此,抗LOXL2疗法尽管具有高度靶特异性,其具有对肿瘤发展产生不利影响的广泛治疗效果。

[0467] 实施例 19 :抗 LOXL2 AB0023 体内抑制肝纤维化和肌成纤维细胞激活

[0468] 在 Balb/C 小鼠中评价抗 LOXL2 和抗 LOX 抗体处理对 CCl₄ 诱导的肝纤维化的有效性。CCl₄ 注射动物引起的显著死亡程度与肝损伤相关且是纤维发生的证据 (图 12 的 A、B 小图), 其可通过抗 LOXL2 抗体 AB0023 防止, 但抗 LOX 特异性抗体 M64 则不能 (AB0023 存活益处的对数秩次检验 $p = 0.0029$, 曼泰尔 - 卡克斯检验 $p = 0.0029$, 图 6 的 A 小图)。分析所有组中存活动物的肝显示 AB0023 显著抑制桥接纤维化 ($p = 0.002$, 图 6 的 B 小图; 图 12 的 C、D 小图), 而抗 LOX M64 处理尽管显示减少桥接纤维化的趋势, 但未达到统计显著性 ($p = 0.127$)。载剂处理 (图 6 的 C 小图) 和 M64 处理动物的肝门隔含有与桥接纤维化相关的显著 α SMA 阳性肌成纤维细胞群。与 AB0023 处理动物中缺失桥接纤维化一致, AB0023 处理动物的肝门隔 (图 6 的 C、D 小图) 中 α SMA 阳性肌成纤维细胞群显著减少, 表明 AB0023 抑制 CCl₄ 诱导的疾病相关成纤维细胞激活。图 6 的 e 小图提供了 α -SMA 信号的定量分析, 证明 AB0023 处理动物的肝中桥接纤维化缺失伴随着 α -SMA 阳性肌成纤维细胞数量的显著减少 ($p = 0.0260$)。这些结果与肌成纤维细胞体内激活需要 LOXL2 相一致, 与上述涉及间质 TAF 的观察类似。

[0469] 参考文献

[0470] Akagawa, H., A. Narita 等. (2007). " Systematic screening of lysyl oxidase-like(LOXL)family genes demonstrates that LOXL2 is a susceptibility gene to intracranial aneurysms. (系统筛选赖氨酰氧化酶样酶 (LOXL) 家族基因证明 LOXL2 是颅内动脉瘤的易感基因)" Hum Genet 121(3-4):377-87.

[0471] Akiri, G., E. Sabo 等. (2003). " Lysyl oxidase-related protein-1 promotes tumor fibrosis and tumor progression in vivo. (赖氨酰氧化酶相关蛋白 -1 体内促进肿瘤纤维化和肿瘤进展)" Cancer Res 63(7):1657-66.

[0472] Asuncion, L., B. Fogelgren 等. (2001). " A novel human lysyl oxidase-like gene(LOXL4)on chromosome 10q24 has an altered scavenger receptor cysteine rich domain. (染色体 10q24 上的一种新型人赖氨酰氧化酶样基因 (LOXL4) 具有改变的清除受体半胱氨酸富集结构域)" Matrix Biol 20(7):487-91. Atsawasuwan, P., Y. Mochida 等. (2008). " Lysyl oxidase binds transforming growth factor-beta and regulates its signaling via amine oxidase activity. (赖氨酰氧化酶结合转化生长因子- β 并通过胺氧化酶活性调节其信号传递)" J Biol Chem 283(49):34229-40.

[0473] Atsawasuwan, P., Y. Mochida 等. (2005). " Expression of lysyl oxidase isoforms in MC3T3-E1 osteoblastic cells. (在 MC3T3-E1 成骨细胞中表达赖氨酰氧化酶同种型)" Biochem Biophys Res Commun 327(4):1042-6.

[0474] Bhowmick, N. A., E. G. Neilson 等. (2004). " Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. (癌症起始和进展中的间质成纤维细胞)" Nature 432(7015):332-7.

[0475] Cardone, A., A. Tolino 等. (1997). " Prognostic value of desmoplastic reaction and lymphocytic infiltration in the management of breast cancer. (结缔组织形成反应和淋巴细胞浸润对调控乳腺癌的预后价值)" Panminerva Med 39(3):174-7.

- [0476] Chang, Y. C., C. B. Liao 等. (2008). " Expression of tumor suppressor p53 facilitates DNA repair but not UV-induced G2/M arrest or apoptosis in Chinese hamster ovary CHO-K1 cells. (肿瘤抑制因子 p53 的表达在中国仓鼠卵巢 CHO-K1 细胞中促进 DNA 修复但不促进 UV 诱导的 G2/M 阻滞或细胞凋亡)" J Cell Biochem 103(2) : 528-37.
- [0477] Chen, W., X. Wang 等. (2008). " Blockage of NF-kappaB by IKKbeta-or RelA-siRNA rather than the NF-kappaB super-suppressor IkappaBalpha mutant potentiates adriamycin-induced cytotoxicity in lung cancer cells. (由 IKK β -或 RelA-siRNA 而不是 NF- κ B 超抑制因子 I κ B α 突变体阻断 NF- κ B 可增强肺癌细胞中阿霉素诱导的细胞毒性)" J Cell Biochem 105(2) :554-61.
- [0478] Chichester, C. O., K. C. Palmer 等. (1981). " Lung lysyl oxidase and prolyl hydroxylase:increases induced by cadmium chloride inhalation and the effect of beta-aminopropionitrile in rats. (肺赖氨酰氧化酶和脯氨酰羟化酶:由氯化镉吸入诱导的增加和 β -氨基丙腈在大鼠中的效果)" Am Rev Respir Dis 124(6) :709-13.
- Chioza, B. A., A. Ujfalussy 等. (2001). " Mutations in the lysyl oxidase gene are not associated with amyotrophic lateral sclerosis. (赖氨酰氧化酶基因突变与肌萎缩侧索硬化症不关联)" Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 2(2) :93-7.
- [0479] Chu, T. J. 和 D. G. Peters(2008). " Serial analysis of the vascular endothelial transcriptome under static and shear stress conditions. (对稳定和剪切应力条件下血管内皮转录组的序列分析)" Physiol Genomics 34(2) :185-92.
- [0480] Chu, W. K., P. M. Dai 等. (2008). " Glycogen synthase kinase-3beta regulates DeltaNp63 gene transcription through the beta-catenin signaling pathway. (糖原合酶激酶-3 β 通过 β -联蛋白信号途径调节 δ Np63 基因转录)" J Cell Biochem 105(2) :447-53.
- [0481] Conti, J. A., T. J. Kendall 等. (2008). " The desmoplastic reaction surrounding hepatic colorectal adenocarcinoma metastases aids tumor growth and survival via alphav integrin ligation. (肝结直肠癌转移周边的结缔组织形成反应经 α_v 整合蛋白连接协助肿瘤生长和存活)" Clin Cancer Res 14(20) :6405-13.
- [0482] Copel 和 R. A. (2005). Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery : a guide for medicinal chemists and pharmacologists (《药物发现中的酶抑制剂评估 : 医药化学家与药物学家指南》). 新泽西州霍博肯的韦利科学公司 (Wiley-Interscience).
- [0483] Csiszar, K. (2001). " Lysyl oxidases:a novel multifunctional amine oxidase family. (赖氨酰氧化酶:一种新型多功能胺氧化酶家族)" Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 70 :1-32.
- [0484] Csiszar, K., I. Entersz. (1996). " Functional analysis of the promoter and first intron of the human lysyl oxidase gene. (人赖氨酰氧化酶基因启动子和首个内含子的功能分析)" Mol Biol Rep 23(2) :97-108.
- [0485] Csiszar, K., S. F. Fong. (2002). " Somatic mutations of the lysyl oxidase gene on chromosome 5q23.1in colorectal tumors. (结直肠癌中染色体 5q23.1 上的赖氨

酰氧化酶基因体细胞突变) " Int J Cancer 97(5) :636-42.

[0486] Decitre, M., C. Gleyzal 等. (1998). " Lysyl oxidase-like protein localizes to sites of de novo fibrinogenesis in fibrosis and in the early stromal reaction of ductal breast carcinomas. (赖氨酰氧化酶样蛋白在纤维化和乳腺导管癌早期间质反应中定位于从头纤维生成的位置) " Lab Invest 78(2) :143-51.

[0487] Di, L. J., L. Wang 等. (2008). " Identification of long range regulatory elements of mouse alpha-globin gene cluster by quantitative associated chromatin trap (QACT). (通过定量相关染色质陷阱 (QACT) 鉴定小鼠 α 球蛋白基因簇的长范围调节元件) " J Cell Biochem 105(1) :301-12.

[0488] El Mabrouk, M., H. Y. Qureshi 等. (2008). " Interleukin-4 antagonizes oncostatin M and transforming growth factor beta-induced responses in articular chondrocytes. (白介素-4 在关节软骨细胞中拮抗抑瘤素 M 和转化生长因子 β 诱导的反应) " J Cell Biochem 103(2) :588-97.

[0489] Erler, J. T., K. L. Bennewith 等 (2009). " Hypoxia-induced lysyl oxidase is a Critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. (低氧诱导的赖氨酰氧化酶是骨髓细胞募集形成转移前生境的关键介导因子) " Cancer Cell 15(1) :35-44.

[0490] Erler, J. T., K. L. Bennewith 等 (2006). " Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. (赖氨酰氧化酶对于低氧诱导的转移是必需的) " Nature 440(7088) :1222-6.

[0491] Erler, J. T. 和 A. J. Giaccia (2006). " Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. (赖氨酰氧化酶介导转移的低氧控制) " Cancer Res 66(21) :10238-41.

[0492] Fogelgren, B., N. Polgar 等. (2005). " Cellular fibronectin binds to lysyl oxidase with high affinity and is critical for its proteolytic activation. (细胞纤连蛋白以高亲和性结合赖氨酰氧化酶且对于其蛋白裂解激活关键) " J Biol Chem 280(26) :24690-7.

[0493] Fong, S. F., E. Dietzsch 等. (2007). " Lysyl oxidase-like 2 expression is increased in colon and esophageal tumors and associated with less differentiated colon tumors. (赖氨酰氧化酶样 2 表达在结肠和食管肿瘤中增加且与分化较少的结肠肿瘤相关联) " Genes Chromosomes Cancer 46(7) :644-55.

[0494] Gacheru, S. N., K. M. Thomas 等 (1997). " Transcriptional and post-transcriptional control of lysyl oxidase expression in vascular smooth muscle cells: effects of TGF- β 1 and serum deprivation. (血管平滑肌细胞中赖氨酰氧化酶表达的转录和转录后控制: TGF- β 1 和血清耗竭的影响) " J Cell Biochem 65(3) :395-407.

[0495] Gorogh, T., C. Holtmeier 等 (2008). " Functional analysis of the 5' flanking domain of the LOXL4 gene in head and neck squamous cell carcinoma cells. (头颈部鳞状细胞癌细胞中 LOXL4 基因 5' 侧翼结构域的功能分析) " Int J Oncol

33(5):1091-8.

[0496] Gorogh, T., J.B.Weise 等 (2007). " Selective upregulation and amplification of the lysyl oxidase like-4(LOXL4)gene in head and neck squamous cell carcinoma. (头颈部鳞状细胞癌中赖氨酰氧化酶样 4(LOXL4) 基因的选择性上调和扩增)" J Pathol 212(1):74-82.

[0497] Han, C., K.Lim 等 (2008). " Regulation of Wnt/beta-catenin pathway by cPLA2alpha and PPARdelta. (通过 cPLA2 α 和 PPAR δ 调节 Wnt/ β -联蛋白途径)" J Cell Biochem 105(2):534-45.

[0498] Hayashi, K., K.S.Fong 等 (2004). " Comparative immunocytochemical localization of lysyl oxidase(LOX)and the lysyl oxidase-like(LOXL)proteins: changes in the expression of LOXL during development and growth of mouse tissues. (赖氨酰氧化酶 (LOX) 和赖氨酰氧化酶样 (LOXL) 蛋白的比较性免疫细胞化学定位:小鼠组织发育和生长期间 LOXL 表达的变化)" J Mol Histol 35(8-9):845-55.

[0499] He, S., K.L.Dunn 等 (2008). " Chromatin organization and nuclear microenvironments in cancer cells. (癌细胞中染色质构造和核微环境)" J Cell Biochem 104(6):2004-15.

[0500] Hein, S., S.Y.Yamamoto 等 (2001). " Lysyl oxidases:expression in the fetal membranes and placenta. (赖氨酰氧化酶:胎膜和胎盘中的表达)" Placenta 22(1):49-57.

[0501] Ho, C.Y., C.H.Wong 等 (2008). " Perturbation of the chromosomal binding of RCC1, Mad2 and survivin causes spindle assembly defects and mitotic catastrophe. (扰乱染色体结合 RCC1、Mad2 和生存素导致纺锤体组装缺陷和有丝分裂障碍)" J Cell Biochem 105(3):835-46.

[0502] Hollosi, P., J.K.Yakushiji 等 (2009). " Lysyl oxidase-like 2 promotes migration in noninvasive breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. (赖氨酰氧化酶样 2 促进非侵袭性乳腺癌细胞而不是正常乳腺上皮细胞中的迁移)" Int J Cancer.

[0503] Jansen, M.K. 和 K.Csiszar(2007). " Intracellular localization of the matrix enzyme lysyl oxidase in polarized epithelial cells. (极性上皮细胞中基质酶赖氨酰氧化酶的胞内定位)" Matrix Biol 26(2):136-9.

[0504] Jeong, J.H., J.Y.An 等 (2008). " Quercetin-induced ubiquitination and down-regulation of Her-2/neu. (槲皮素诱导的 Her-2/neu 泛素化和下调)" J Cell Biochem 105(2):585-95.

[0505] Jin, C.X., W.L.Li 等 (2008). " Conversion of immortal liver progenitor cells into pancreatic endocrine progenitor cells by persistent expression of Pdx-1. (通过持续表达 Pdx-1 将永生化肝祖细胞转化成胰腺内分泌祖细胞)" J Cell Biochem 104(1):224-36.

[0506] Jourdan-Le Saux, C., O.Le Saux 等 (1998). " The human lysyl oxidase-related gene (LOXL2)maps between markers D8S280 and D8S278 on

chromosome 8p21.2-p21.3. (人赖氨酰氧化酶相关基因 (LOXL2) 在染色体 8p21.2-p21.3 上标记 D8S280 和 D8S278 间的图谱)" Genomics 51(2):305-7.

[0507] Jourdan-Le Saux, C., O. Le Saux 等 (2000). "The mouse lysyl oxidase-like 2 gene (mLOXL2) maps to chromosome 14 and is highly expressed in skin, lung and thymus. (小鼠赖氨酰氧化酶样 2 基因 (mLOXL2) 对染色体 14 作图并在皮肤、肺和胸腺中高度表达)" Matrix Biol 19(2):179-83.

[0508] Jourdan-Le Saux, C., H. Tronecker 等 (1999). "The LOXL2 gene encodes a new lysyl oxidase-like protein and is expressed at high levels in reproductive tissues. (LOXL2 基因编码新赖氨酰氧化酶样蛋白并在生殖组织中高水平表达)" J Biol Chem 274(18):12939-44.

[0509] Jung, S. T., M. S. Kim 等 (2003). "Purification of enzymatically active human lysyl oxidase and lysyl oxidase-like protein from Escherichia coli inclusion bodies. (从大肠杆菌内含体中纯化具有酶活性的人赖氨酰氧化酶和赖氨酰氧化酶样蛋白)" Protein Expr Purif 31(2):240-6.

[0510] Kagan, H. M., V. B. Reddy 等 (1995). "Catalytic properties and structural components of lysyl oxidase. (赖氨酰氧化酶的催化性质和结构组分)" Ciba Found Symp 192:100-15; 讨论 115-21.

[0511] Kaku, M., Y. Mochida 等 (2007). "Post-translational modifications of collagen upon BMP-induced osteoblast differentiation. (BMP 诱导成骨细胞分化后胶原的翻译后修饰)" Biochem Biophys Res Commun 359(3):463-8.

[0512] Kim, M. S., S. S. Kim 等 (2003). "Expression and purification of enzymatically active forms of the human lysyl oxidase-like protein 4. (人赖氨酰氧化酶样蛋白 4 的酶活性形式的表达和纯化)" J Biol Chem 278(52):52071-4.

[0513] Kim, Y., C. D. Boyd 等 (1995). "A new gene with sequence and structural similarity to the gene encoding human lysyl oxidase. (和人赖氨酰氧化酶编码基因具有序列和结构相似性的新基因)" J Biol Chem 270(13):7176-82.

[0514] Kim, Y., C. D. Boyd 等 (1997). "A highly polymorphic (CA) repeat sequence in the human lysyl oxidase-like gene. (人赖氨酰氧化酶样基因中的高度多态性 (CA) 重复序列)" Clin Genet 51(2):131-2.

[0515] Kim, Y., S. Peyrol 等 (1999). "Coexpression of the lysyl oxidase-like gene (LOXL) and the gene encoding type III procollagen in induced liver fibrosis. (诱导的肝纤维化中赖氨酰氧化酶样基因 (LOXL) 与 III 型前胶原编码基因的共表达)" J Cell Biochem 72(2):181-8.

[0516] Kirschmann, D. A., E. A. Seftor 等 (2002). "A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. (赖氨酰氧化酶在乳腺癌侵袭中的分子作用)" Cancer Res 62(15):4478-83.

[0517] Klutke, J., Q. Ji 等 (2008). "Decreased endopelvic fascia elastin content in uterine prolapse. (子宫脱垂中的内骨盆筋膜弹性蛋白含量减少)" Acta Obstet Gynecol Scand 87(1):111-5.

- [0518] Kresse, S. H., M. Skarn 等 (2008). " DNA copy number changes in high-grade malignant peripheral nerve sheath tumors by array CGH. (通过比较基因组杂交的高分级恶性周边神经鞘瘤的 DNA 拷贝数变化)" Mol Cancer 7:48.
- [0519] Laczko, R., K. M. Szauter 等 (2007). " Active lysyl oxidase (LOX) correlates with focal adhesion kinase (FAK)/paxillin activation and migration in invasive astrocytes. (活性赖氨酰氧化酶 (LOX) 在侵入性星形细胞中与粘着斑激酶 (FAK)/ 桩蛋白激活和迁移相关联)" Neuropathol Appl Neurobiol 33(6):631-43.
- [0520] Lalancette, C., D. Miller 等 (2008). " Paternal contributions: new functional insights for spermatozoal RNA. (父系的贡献: 对精子 RNA 的新功能认识)" J Cell Biochem 104(5):1570-9.
- [0521] Lelievre, E., A. Hinek 等 (2008). " VE-statin/egf17 regulates vascular elastogenesis by interacting with lysyl oxidases. (VE-抑制素/egf17通过与赖氨酰氧化酶相互作用来调节血管弹性纤维生成)" EMBO J 27(12):1658-70.
- [0522] Leskovac, V. (2003). Comprehensive enzyme kinetics (《综合酶动力学》). 纽约的克鲁学术出版社 (Kluwer Academic)/ 普莱努出版社 (Plenum Pub).
- [0523] Li, H., X. Fan 等 (2007). " Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. (肿瘤微环境: 肿瘤间质在癌症中的作用)" J Cell Biochem 101(4):805-15. Liang, S., B. Moghimi 等 (2008). " Locus control region mediated regulation of adult beta-globin gene expression. (基因座控制区介导成人 β 球蛋白基因表达的调节)" J Cell Biochem 105(1):9-16.
- [0524] Liao, P. C., S. K. Tan 等 (2008). " Involvement of endoplasmic reticulum in paclitaxel-induced apoptosis. (内质网参与紫杉醇诱导的细胞凋亡)" J Cell Biochem 104(4):1509-23.
- [0525] Liao, Q. C., Y. L. Li 等 (2008). " Inhibition of adipocyte differentiation by phytoestrogen genistein through a potential downregulation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 activity. (植物激素木黄酮通过潜在下调胞外信号调节激酶 1/2 活性抑制脂肪细胞分化)" J Cell Biochem 104(5):1853-64.
- [0526] Liao, R., J. Sun 等 (2008). " MicroRNAs play a role in the development of human hematopoietic stem cells. (微 RNA 在人造血干细胞发育中起作用)" J Cell Biochem 104(3):805-17.
- [0527] Liu, B. F. 和 J. J. Liang (2008). " Confocal fluorescence microscopy study of interaction between lens MIP26/AQP0 and crystallins in living cells. (共焦荧光显微镜研究活细胞中晶状体 MIP26/AQP0 和晶状体蛋白间的相互作用)" J Cell Biochem 104(1):51-8.
- [0528] Lu, H. T., Y. C. Liang 等 (2008). " Disease-modifying effects of glucosamine HCl involving regulation of metalloproteinases and chemokines activated by interleukin-1 β in human primary synovial fibroblasts. (葡萄糖胺 HCl 的疾病改善效果包括调节人原代滑膜成纤维细胞中金属蛋白酶和白介素-1 β 激活的趋化因子)" J Cell Biochem 104(1):38-50.

- [0529] Lucero, H. A. 和 H. M. Kagan (2006). " Lysyl oxidase :an oxidative enzyme and effector of cell function. (赖氨酰氧化酶:氧化酶和细胞功能效应物)" *Cell Mol Life Sci* 63(19-20) :2304-16.
- [0530] Ma, J., F. Zeng 等 (2008). " Characterization and functional studies of a FYVE domain-containing phosphatase in *C. elegans*. (秀丽隐杆线虫中含FYVE结构域的磷酸酶的表征和功能性研究)" *J Cell Biochem* 104(5) :1843-52.
- [0531] Macartney-Coxson, D. P., K. A. Hood 等 (2008). " Metastatic susceptibility locus, an 8p hot-spot for tumour progression disrupted in colorectal liver metastases :13 candidate genes examined at the DNA, mRNA and protein level. (转移性易感基因座,在结直肠肝转移中破坏肿瘤进展的8p热点 :在DNA、mRNA和蛋白水平检测的13个候选基因)" *BMC Cancer* 8 :187.
- [0532] Maeshima, A. M., T. Niki 等 (2002). " Modified scar grade:a prognostic indicator in small peripheral lung adenocarcinoma. (改善疤痕分级 :小周边肺腺癌的预后指示物)" *Cancer* 95(12) :2546-54.
- [0533] Maki, J. M. 和 K. I. Kivirikko (2001). " Cloning and characterization of a fourth human lysyl oxidase isoenzyme. (第4种人赖氨酰氧化酶同工酶的克隆和表征)" *Biochem J* 355(Pt 2) :381-7.
- [0534] Maki, J. M., H. Tikkanen 等 (2001). " Cloning and characterization of a fifth human lysyl oxidase isoenzyme:the third member of the lysyl oxidase-related subfamily with four scavenger receptor cysteine-rich domains. (第5种人赖氨酰氧化酶同工酶的克隆和表征 :具有4个清道夫受体半胱氨酸富集结构域的赖氨酰氧化酶相关亚族的第三成员)" *Matrix Biol* 20(7) :493-6.
- [0535] McElroy, K. E., P. J. Bouchard 等 (2000). " Implementation of a continuous, enzyme-coupled fluorescence assay for high-throughput analysis of glutamate-producing enzymes. (实施持续的酶偶联荧光实验用于高通量分析谷氨酸生成酶)" *Anal Biochem* 284(2) :382-7.
- [0536] Molnar, J., K. S. Fong 等 (2003). " Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. (赖氨酰氧化酶和LOX样蛋白的结构和功能多样性)" *Biochim Biophys Acta* 1647(1-2) :220-4.
- [0537] Molnar, J., Z. Ujfaludi 等 (2005). " *Drosophila* lysyl oxidases Dmlox1-1 and Dmlox1-2 are differentially expressed and the active DmLOXL-1 influences gene expression and development. (果蝇赖氨酰氧化酶Dmlox1-1和Dmlox1-2差异表达和活性DmLOXL-1影响基因表达和发育)" *J Biol Chem* 280(24) :22977-85.
- [0538] Monticone, M., Y. Liu 等 (2004). " Gene expression profile of human bone marrow stromal cells determined by restriction fragment differential display analysis. (通过限制性片段差异展示分析测定人骨髓间质细胞的基因表达分布)" *J Cell Biochem* 92(4) :733-44.
- [0539] Muller, K. C., L. welker 等 (2006). " Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence in vitro. (气肿患者的肺成纤维细胞显示体外

衰老标记)" Respir Res 7:32.

[0540] Nagaoka, H., Y. Mochida 等 (2008). " 1, 25(OH) 2D3 regulates collagen quality in an osteoblastic cell culture system. (1, 25(OH) 2D3 调节成骨细胞培养系统中的胶原性质)" Biochem Biophys Res Commun 377(2):674-8.

[0541] Nakken, K. E., S. Nygard 等 (2007). " Multiple inflammatory-, tissue remodelling-and fibrosis genes are differentially transcribed in the livers of Abcb4(-/-) mice harbouring chronic cholangitis. (多种炎症、组织重构和纤维化基因在具有慢性胆管炎的 Abcb4(-/-) 小鼠肝中差异性转录)" Scand J Gastroenterol 42(10):1245-55.

[0542] Orimo, A., Y. Tomioka 等 (2001). " Cancer-associated myofibroblasts possess various factors to promote endometrial tumor progression. (癌相关肌成纤维细胞具有各种因子以促进子宫内膜肿瘤进展)" Clin Cancer Res 7(10):3097-105.

[0543] Orimo, A. 和 R. A. Weinberg (2006). " Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. (癌症中的间质成纤维细胞: 一种新的肿瘤促进细胞类型)" Cell Cycle 5(15):1597-601.

[0544] Palamakumbura, A. H. 和 P. C. Trackman (2002). " A fluorometric assay for detection of lysyl oxidase enzyme activity in biological samples. (荧光测定检测生物样品中的赖氨酰氧化酶活性)" Anal Biochem 300(2):245-51.

[0545] Pascal, T., F. Debacq-Chainiaux 等 (2005). " Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays. (结合差异展示和低密度 DNA 阵列比较复制衰老和压力诱导的过早衰老)" FEBS Lett 579(17):3651-9.

[0546] Payne, S. L., B. Fogelgren 等 (2005). " Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. (赖氨酰氧化酶经过氧化氢介导机制调节乳腺癌细胞迁移和粘附)" Cancer Res 65(24):11429-36.

[0547] Payne, S. L., M. J. Hendrix 等 (2007). " Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer—a prospect. (赖氨酰氧化酶在癌症中的矛盾作用——一种预期)" J Cell Biochem 101(6):1338-54.

[0548] Peinado, H., M. Del Carmen Iglesias-de la Cruz 等 (2005). " A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. (赖氨酰氧化酶样 2 酶在 snail 调控和肿瘤进展中的分子作用)" EMBO J 24(19):3446-58.

[0549] Peinado, H., G. Moreno-Bueno 等 (2008). " Lysyl oxidase-like 2 as a new poor prognosis marker of squamous cell carcinomas. (赖氨酰氧化酶样 2 作为鳞状细胞癌的一种新的弱预后标记)" Cancer Res 68(12):4541-50.

[0550] Peinado, H., F. Portillo 等 (2005). " Switching on-off Snail: LOXL2 versus GSK3 β . (打开-关闭 Snail: LOXL2 相比 GSK3 β)" Cell Cycle 4(12):1749-52.

[0551] Pires Martins, R., R. E. Leach 等 (2001). " Whole-body gene expression by data mining. (经数据挖掘的全身基因表达)" Genomics 72(1):34-42.

[0552] Polgar, N., B. Fogelgren 等 (2007). " Lysyl oxidase interacts with hormone placental lactogen and synergistically promotes breast epithelial cell proliferation and migration. (赖氨酰氧化酶与激素胎盘催乳激素相互作用并协同促进乳腺上皮细胞增生和迁移)" J Biol Chem 282(5):3262-72.

[0553] Postovit, L. M., D. E. Abbott 等 (2008). " Hypoxia/reoxygenation: a dynamic regulator of lysyl oxidase-facilitated breast cancer migration. (低氧/复氧: 赖氨酰氧化酶促进乳腺癌迁移的动态调节子)" J Cell Biochem 103(5):1369-78.

[0554] Qi, Y. J., Q. Y. He 等 (2008). " Proteomic identification of malignant transformation-related proteins in esophageal squamous cell carcinoma. (蛋白质组学鉴定食管鳞状细胞癌中的恶性转化相关蛋白)" J Cell Biochem 104(5):1625-35.

[0555] Qiu, J., H. Q. Gao 等 (2008). " Proteomics investigation of protein expression changes in ouabain induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. (人类脐静脉内皮细胞中乌本苷诱导细胞凋亡中蛋白表达变化蛋白质组学研究)" J Cell Biochem 104(3):1054-64.

[0556] Rost, T., V. Pyritz 等 (2003). " Reduction of LOX- and LOXL2-mRNA expression in head and neck squamous cell carcinomas. (头颈部鳞状细胞癌中 LOX- 和 LOXL2-mRNA 表达的减少)" Anticancer Res 23(2B):1565-73.

[0557] Salnikow, K., O. Aprelikova 等 (2008). " Regulation of hypoxia-inducible genes by ETS1 transcription factor. (通过 ETS1 转录因子调节低氧诱导型基因)" Carcinogenesis 29(8):1493-9.

[0558] Schlotzer-Schrehardt, U., F. Pasutto 等 (2008). " Genotype-correlated expression of lysyl oxidase-like 1 in ocular tissues of patients with pseudoexfoliation syndrome/glaucoma and normal patients. (假性剥脱综合征/青光眼和正常患者眼睛组织中赖氨酰氧化酶样 1 的基因型相关表达)" Am J Pathol 173(6):1724-35.

[0559] Schmidt, H., A. Semjonow 等 (2007). " [Mapping of a deletion interval on 8p21-22 in prostate cancer by gene dosage PCR]. (通过基因量 PCR 对前列腺癌中 8p21-22 的缺失间隔作图)" Verh Dtsch Ges Pathol 91:302-7.

[0560] Sebban, S., B. Davidson 等 (2009). " Lysyl oxidase-like 4 is alternatively spliced in an anatomic site-specific manner in tumors involving the serosal cavities. (赖氨酰氧化酶样 4 在涉及浆膜腔的肿瘤中以解剖部位特异性方式可变剪接)" Virchows Arch 454(1):71-9.

[0561] Shen, W., K. Liu 等 (2008). " Protective effects of R- α -lipoic acid and acetyl-L-carnitine in MIN6 and isolated rat islet cells chronically exposed to oleic acid. (R- α -硫辛酸和乙酰-L-肉碱在 MIN6 和长期接触油酸的分离大鼠岛细胞中的保护性效果)" J Cell Biochem 104(4):1232-43.

[0562] Stein, G. S., S. K. Zaidi 等 (2008). " Genetic and epigenetic regulation in nuclear microenvironments for biological control in cancer. (核微环境中的遗传和表观遗传调控用于生物学控制癌症)" J Cell Biochem 104(6):2016-26.

- [0563] Sun, J., G. Watkins 等 (2008). " Deregulation of cofactor of BRCA1 expression in breast cancer cells. (乳腺癌细胞中辅因子 BRCA1 表达的去调控)" J Cell Biochem 103(6) :1798-807.
- [0564] Szabo, Z., E. Light 等 (1997). " The human lysyl oxidase-like gene maps between STS markers D15S215 and GHLC.GCT7C09 on chromosome 15. (染色体 15 上 STS 标记 D15S215 和 GHLC.GCT7C09 间的人赖氨酰氧化酶样基因图)" Hum Genet 101(2) : 198-200.
- [0565] Szauder, K. M., T. Cao 等 (2005). " Lysyl oxidase in development, aging and pathologies of the skin. (皮肤发育、老化和疾病中的赖氨酰氧化酶)" Pathol Biol(巴黎) 53(7) :448-56.
- [0566] Tang, S. S., D. E. Simpson 等 (1984). " Beta-substituted ethylamine derivatives as suicide inhibitors of lysyl oxidase. (β 取代的乙胺衍生物作为赖氨酰氧化酶的自杀性抑制剂)" J Biol Chem 259(2) :975-9.
- [0567] Tang, S. S., P. C. Trackman 等 (1983). " Reaction of aortic lysyl oxidase with beta-aminopropionitrile. (主动脉赖氨酰氧化酶与 β -氨基丙腈的反应)" J Biol Chem 258(7) :4331-8.
- [0568] Trackman, P. C. 和 H. M. Kagan(1979). " Nonpeptidyl amine inhibitors are substrates of lysyl oxidase. (非肽基胺抑制剂是赖氨酰氧化酶的底物)" J Biol Chem 254(16) :7831-6.
- [0569] Trackman, P. C., C. G. Zoski 等 (1981). " Development of a peroxidase-coupled fluorometric assay for lysyl oxidase. (开发赖氨酰氧化酶的过氧化物酶偶联荧光测定)" Anal Biochem 113(2) :336-42.
- [0570] Tsai, C. S., F. Y. Lin 等 (2008). " Cilostazol attenuates MCP-1 and MMP-9 expression in vivo in LPS-administrated balloon-injured rabbit aorta and in vitro in LPS-treated monocytic THP-1 cells. (西洛他唑在体内对施用 LPS、球囊损伤的兔主动脉中和在体外对 LPS 处理的单核 THP-1 细胞中减弱 MCP-1 和 MMP-9 的表达)" J Cell Biochem 103(1) :54-66.
- [0571] Urban, Z., O. Agapova 等 (2007). " Population differences in elastin maturation in optic nerve head tissue and astrocytes. (视神经头组织和星形细胞中弹性蛋白成熟的群体差异)" Invest Ophthalmol Vis Sci 48(7) :3209-15.
- [0572] Vadasz, Z., O. Kessler 等 (2005). " Abnormal deposition of collagen around hepatocytes in Wilson's disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2. (威尔森氏症中肝细胞周围胶原的异常沉积与赖氨酰氧化酶和赖氨酰氧化酶样蛋白-2 的肝细胞特异性表达相关)" J Hepatol 43(3) :499-507.
- [0573] Wang, Q. R., B. H. Wang 等 (2008). " Purification and growth of endothelial progenitor cells from murine bone marrow mononuclear cells. (来自鼠骨髓单核细胞的内皮祖细胞的纯化和生长)" J Cell Biochem 103(1) :21-9.
- [0574] Wang, X. M., J. Li 等 (2008). " Involvement of the role of Chk1 in

lithium-induced G2/M phase cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma cells. (Chk1 在肝细胞癌细胞中参与锂诱导 G2/M 期细胞周期阻滞的作用) " J Cell Biochem 104(4) :1181-91. Welse, J.B., P. Rudolph 等. (2008). " LOXL4 is a selectively expressed candidate diagnostic antigen in head and neck cancer. (" LOXL4 是选择性表达的头颈癌诊断抗原候选) " Eur J Cancer 44(9) :1323-31.

[0575] Wu, M., Q. Chen 等 (2008). " LRRC4 inhibits human glioblastoma cells proliferation, invasion, and proMMP-2 activation by reducing SDF-1 α /CXCR4-mediated ERK1/2 and Akt signaling pathways. (LRRC4 通过减少 SDF-1 α /CXCR4 介导的 ERK1/2 和 Akt 信号途径抑制人恶性胶质瘤细胞增生、侵袭和 proMMP-2 激活) " J Cell Biochem 103(1) :245-55.

[0576] Yang, H., K. R. Landis-Piwowar 等 (2008). " Pristimerin induces apoptosis by targeting the proteasome in prostate cancer cells. (前列腺癌细胞中扁蒴藤素通过靶向蛋白酶体来诱导细胞凋亡) " J Cell Biochem 103(1) :234-44.

[0577] Yang, Y. L., S. Y. Chang 等 (2008). " Safflower extract :a novel renal fibrosis antagonist that functions by suppressing autocrine TGF- β . (红花提取物 :通过抑制自分泌 TGF- β 起作用的新型肾纤维化拮抗剂) " J Cell Biochem 104(3) : 908-19.

[0578] Yu, Z., W. Li 等. (2008). " p21 is required for atRA-mediated growth inhibition of MEPM cells, which involves RAR. (atRA 介导的 MEPM 细胞生长抑制需要 p21, 其中涉及 RAR) " J Cell Biochem 104(6) :2185-92.

[0579] Zhang, Y., M. Q. Hassan 等 (2008). " Intricate gene regulatory networks of helix-loop-helix(HLH) proteins support regulation of bone-tissue related genes during osteoblast differentiation. (螺旋环螺旋 (HLH) 蛋白的复杂基因调控网支持成骨细胞分化中骨组织相关基因的调节) " J Cell Biochem 105(2) :487-96.

[0580] Zhao, H., Y. Liang 等 (2008). " N-glycosylation affects the adhesive function of E-Cadherin through modifying the composition of adherens junctions(AJs) in human breast carcinoma cell line MDA-MB-435. (N-糖基化通过改变人乳腺癌细胞系 MDA-MB-435 中粘着结合 (AJ) 的组成来影响 E-钙粘素的粘附功能) " J Cell Biochem 104(1) :162-75.

[0581] Zheng, M., X. Gu 等 (2008). " UBE1DC1, an ubiquitin-activating enzyme, activates two different ubiquitin-like proteins. (泛素激活酶 UBE1DC1 活化 2 种不同的泛素样蛋白) " J Cell Biochem 104(6) :2324-34.

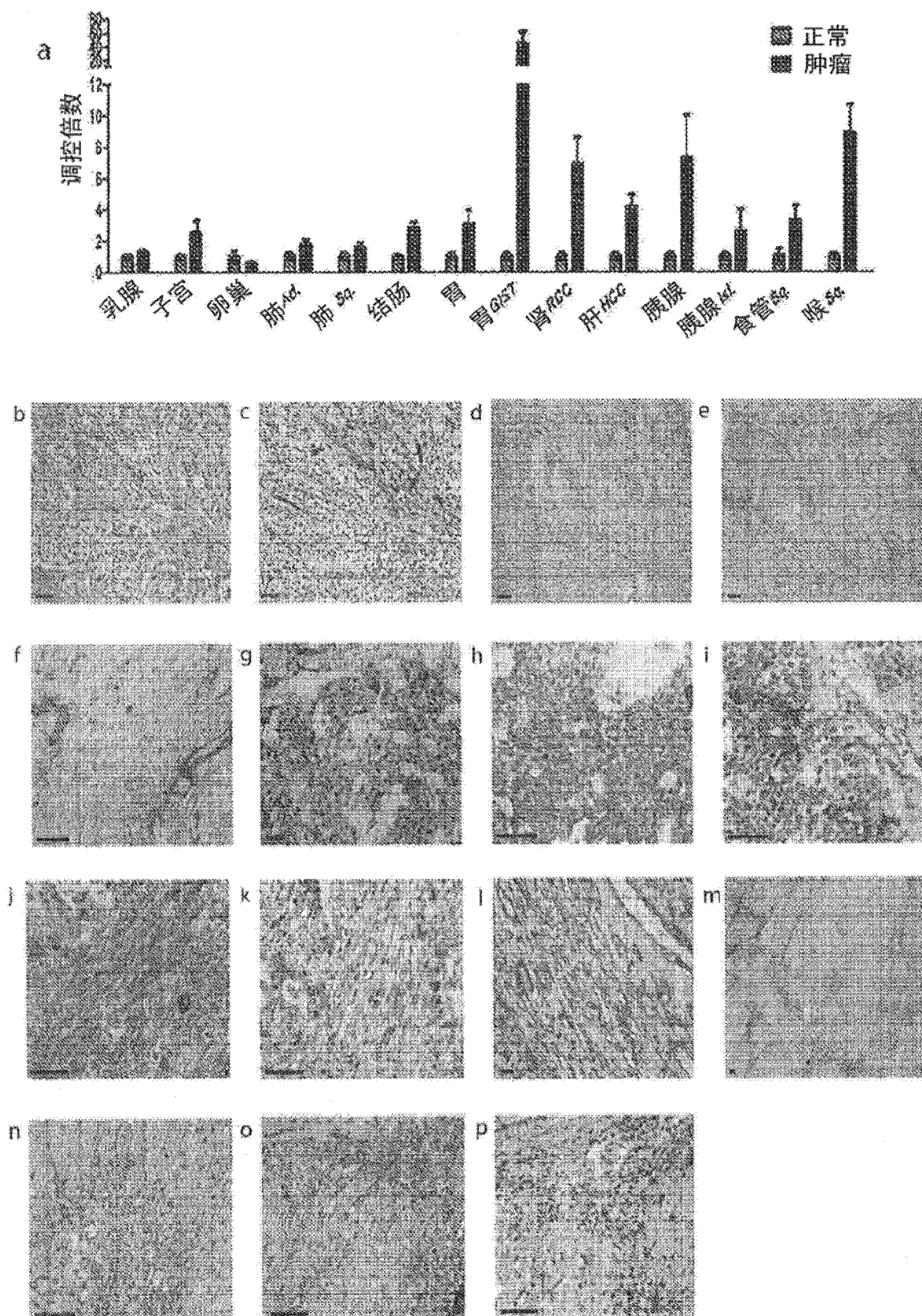


图 1

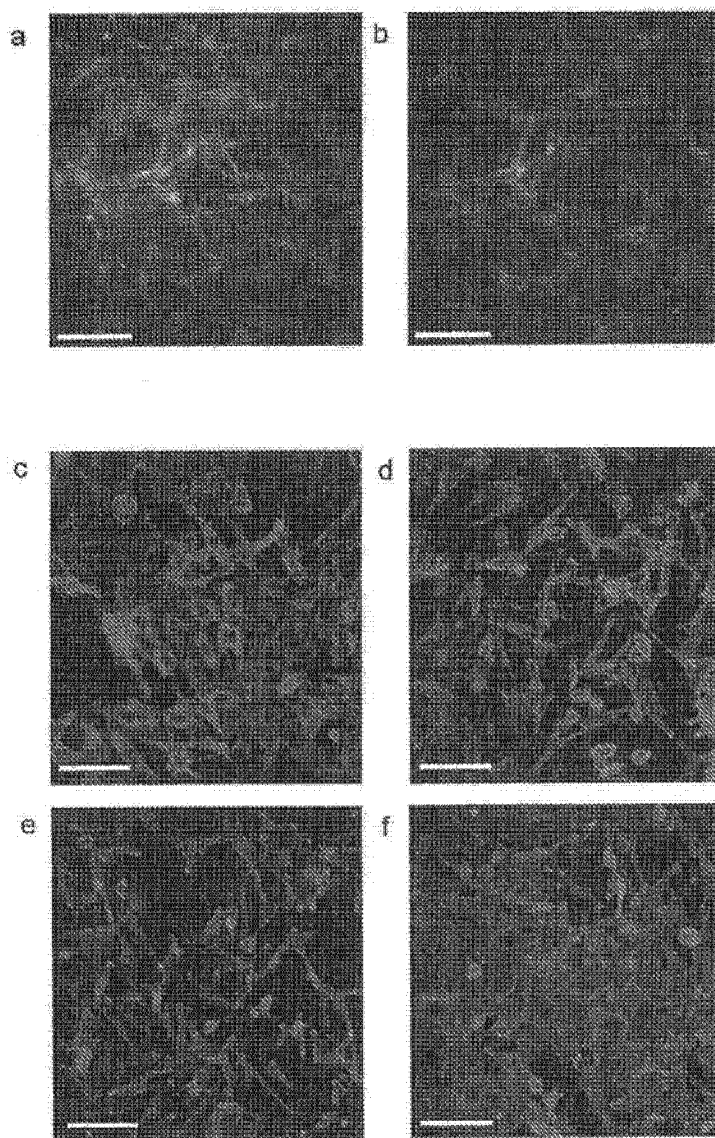


图 2

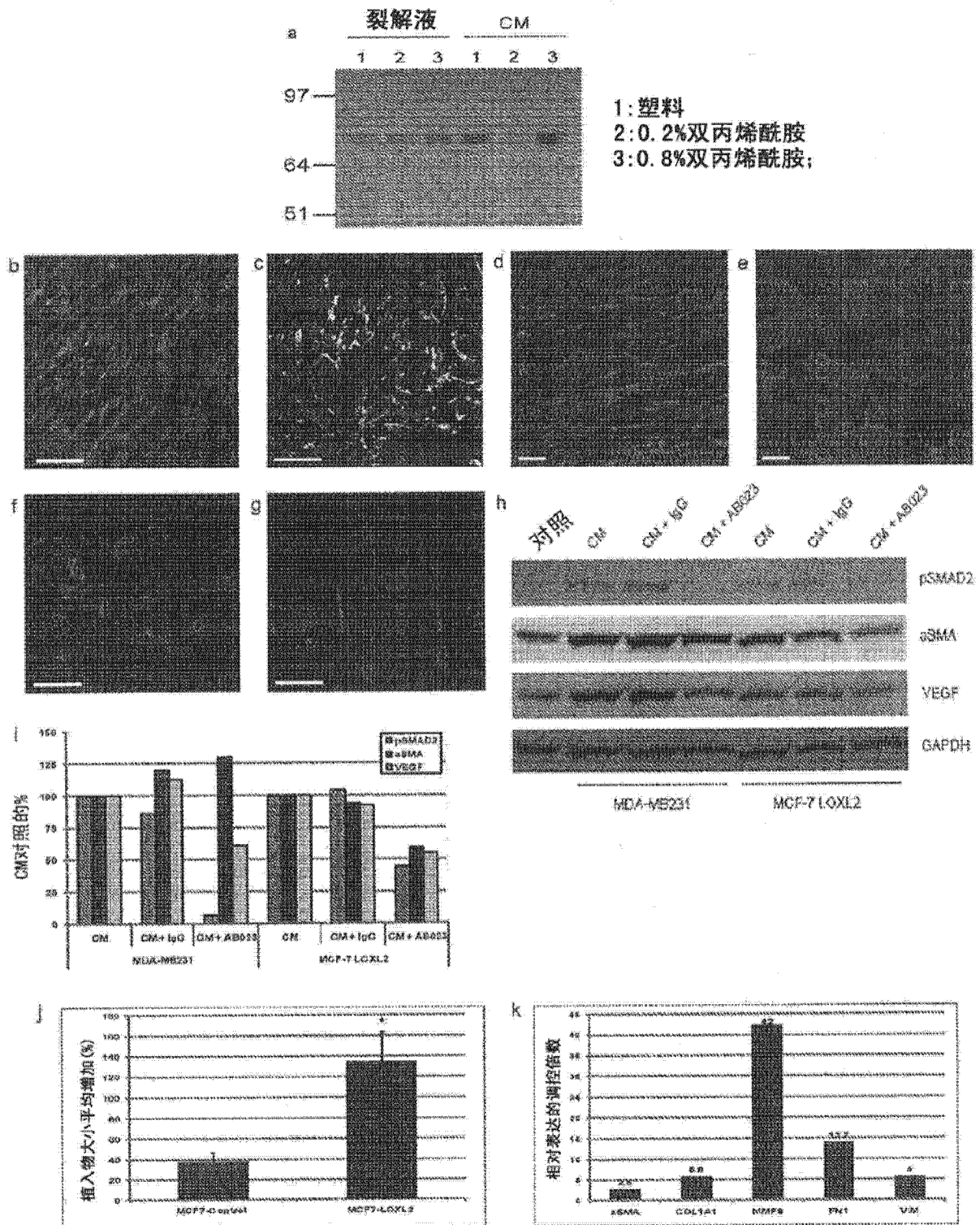


图 3

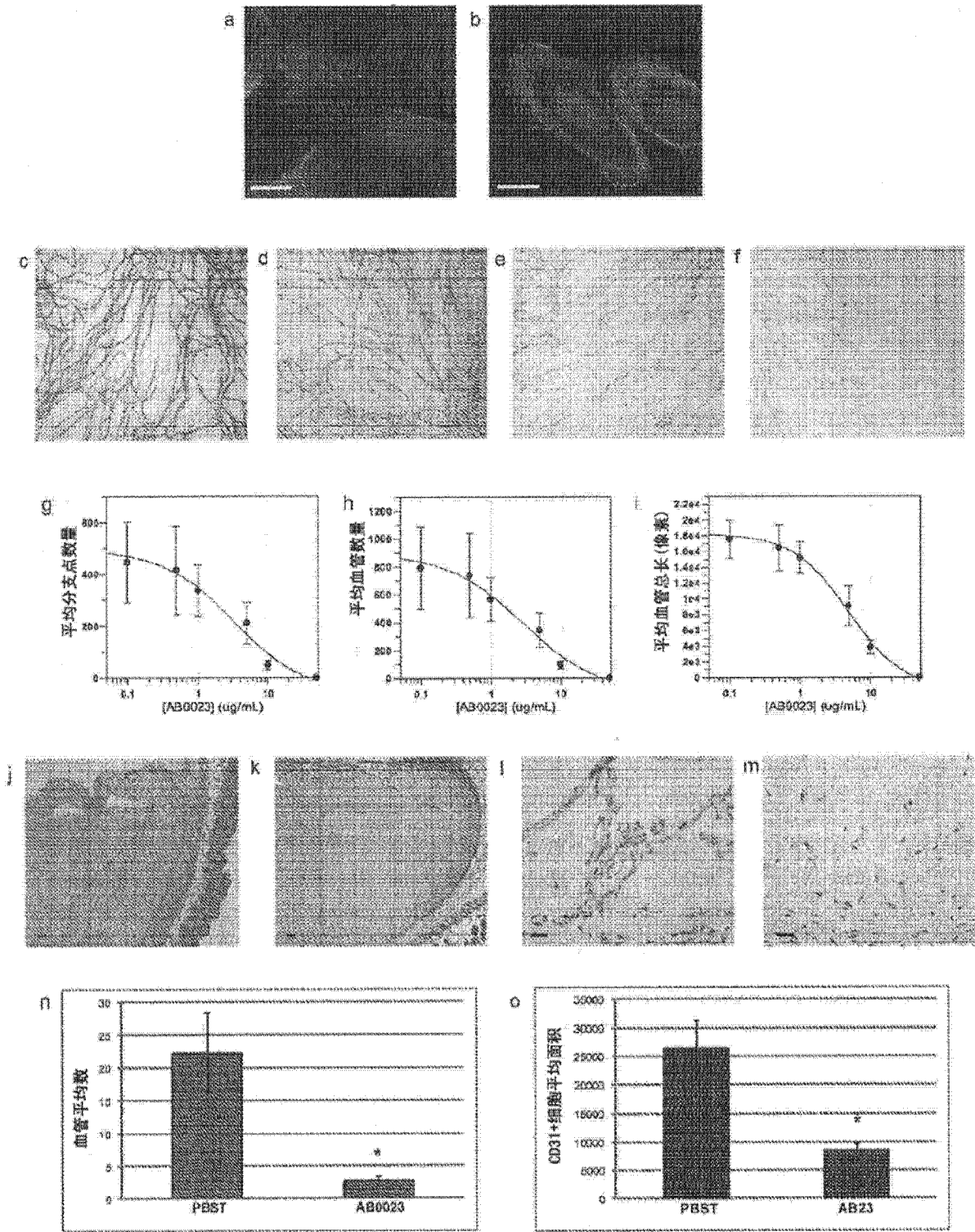
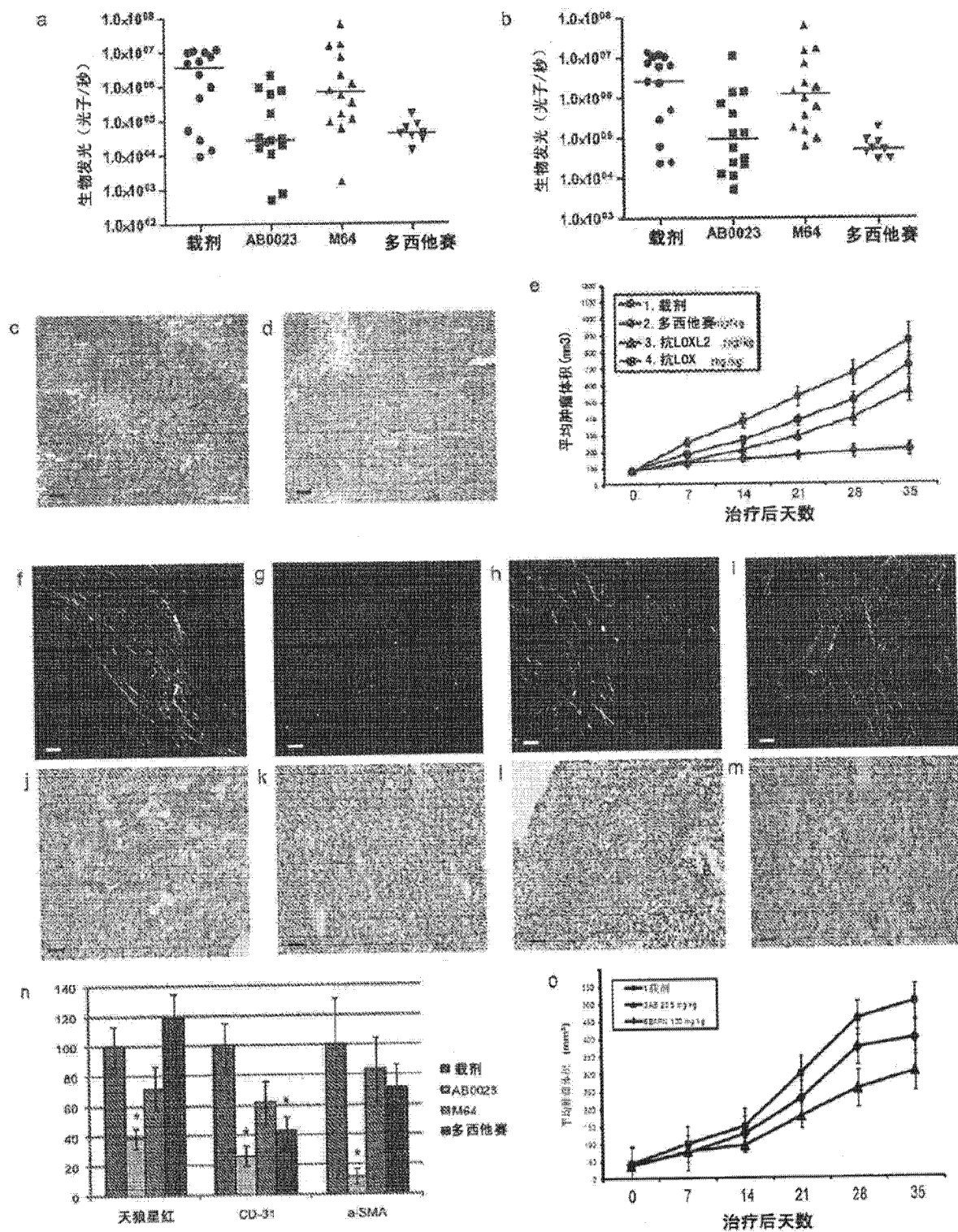


图 4



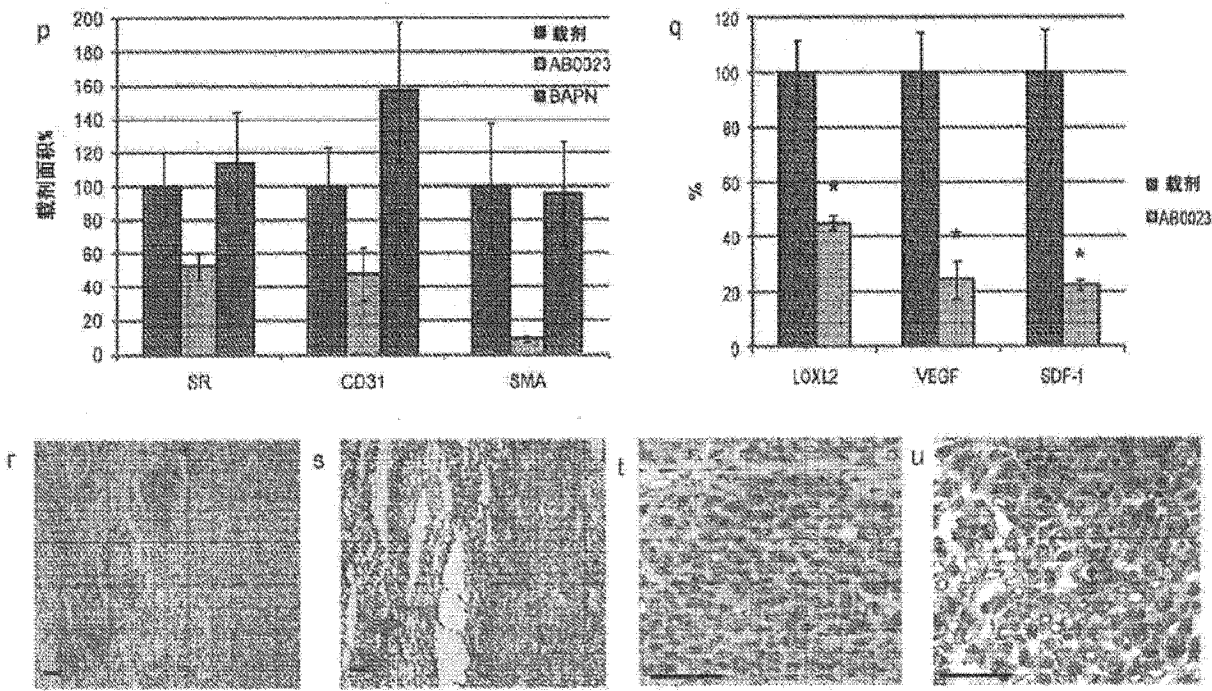


图 5

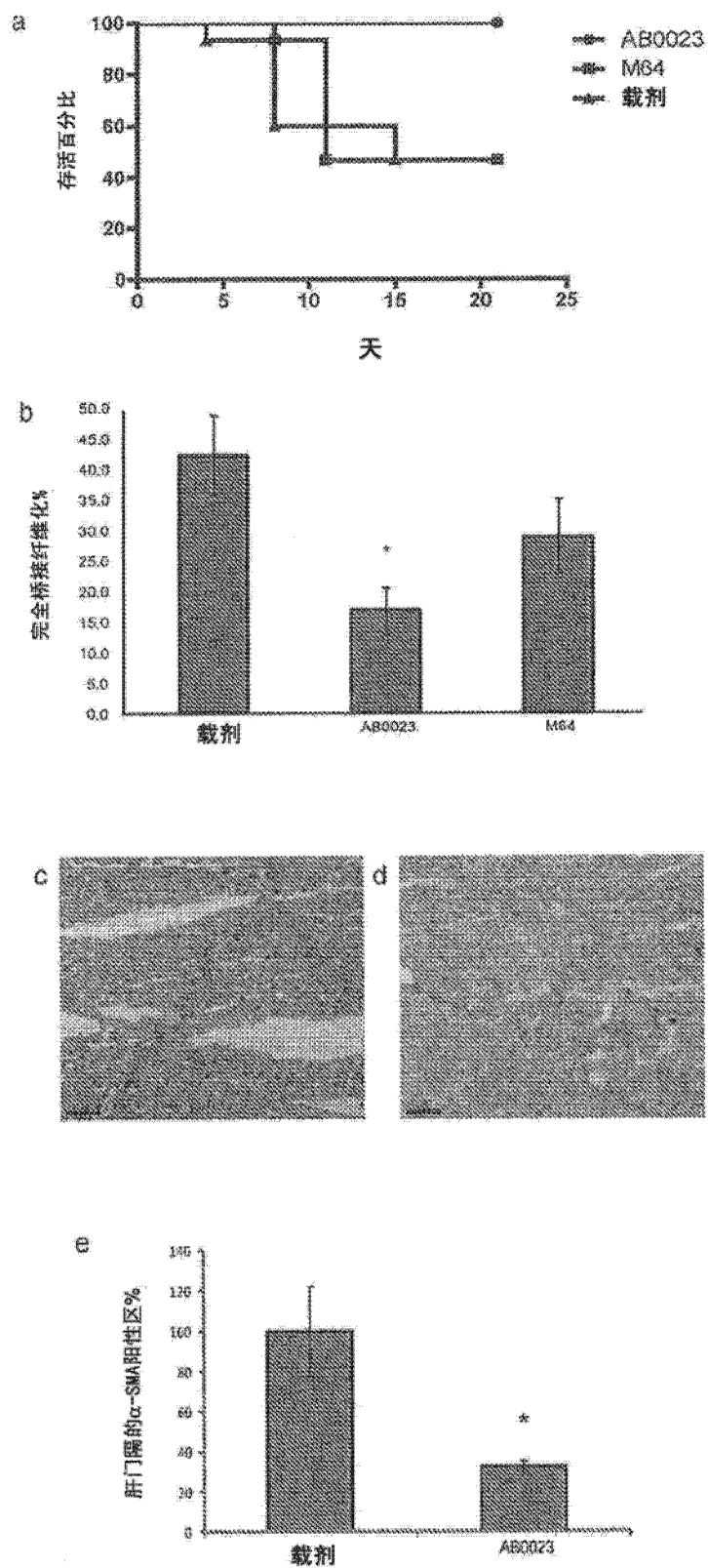
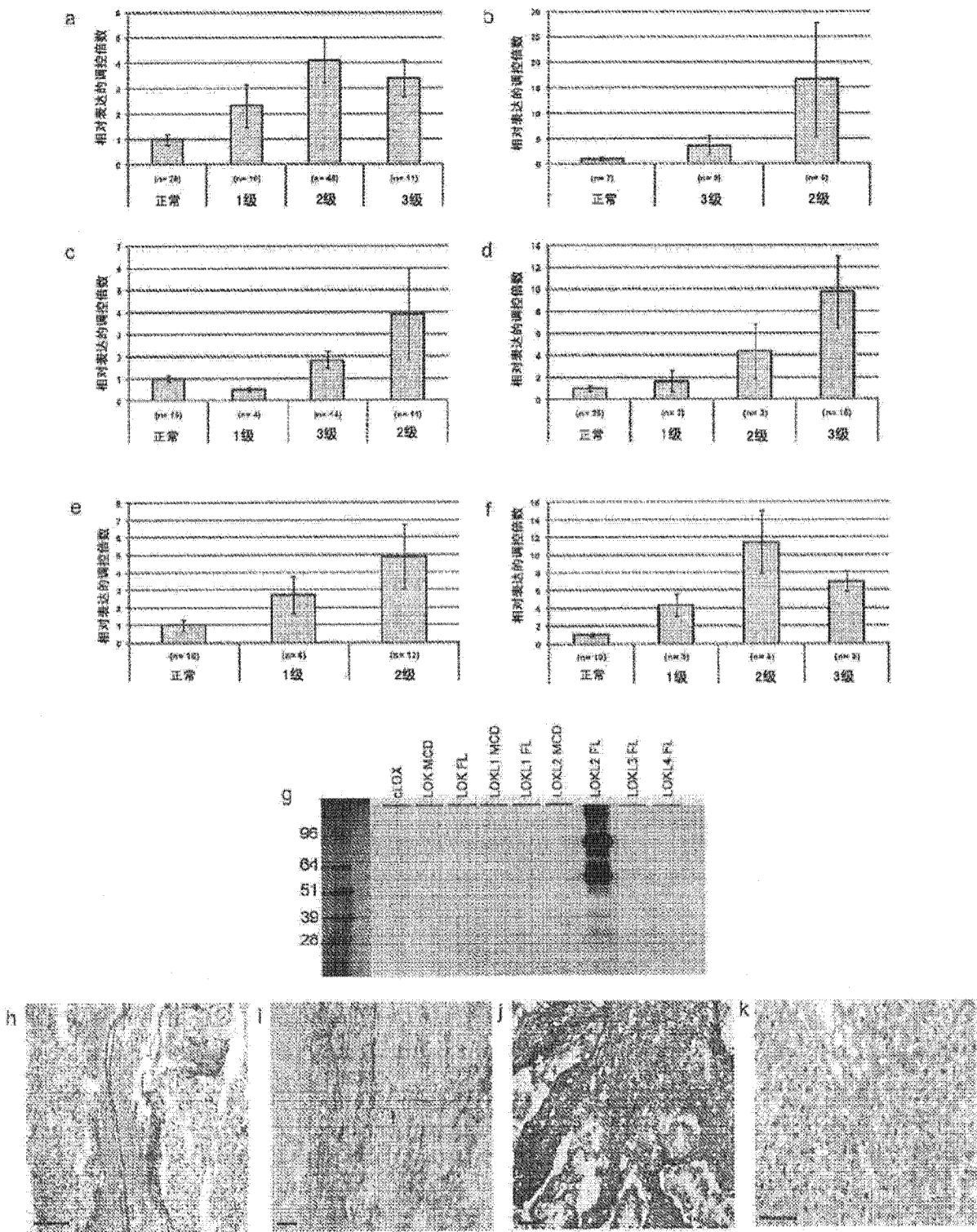


图 6



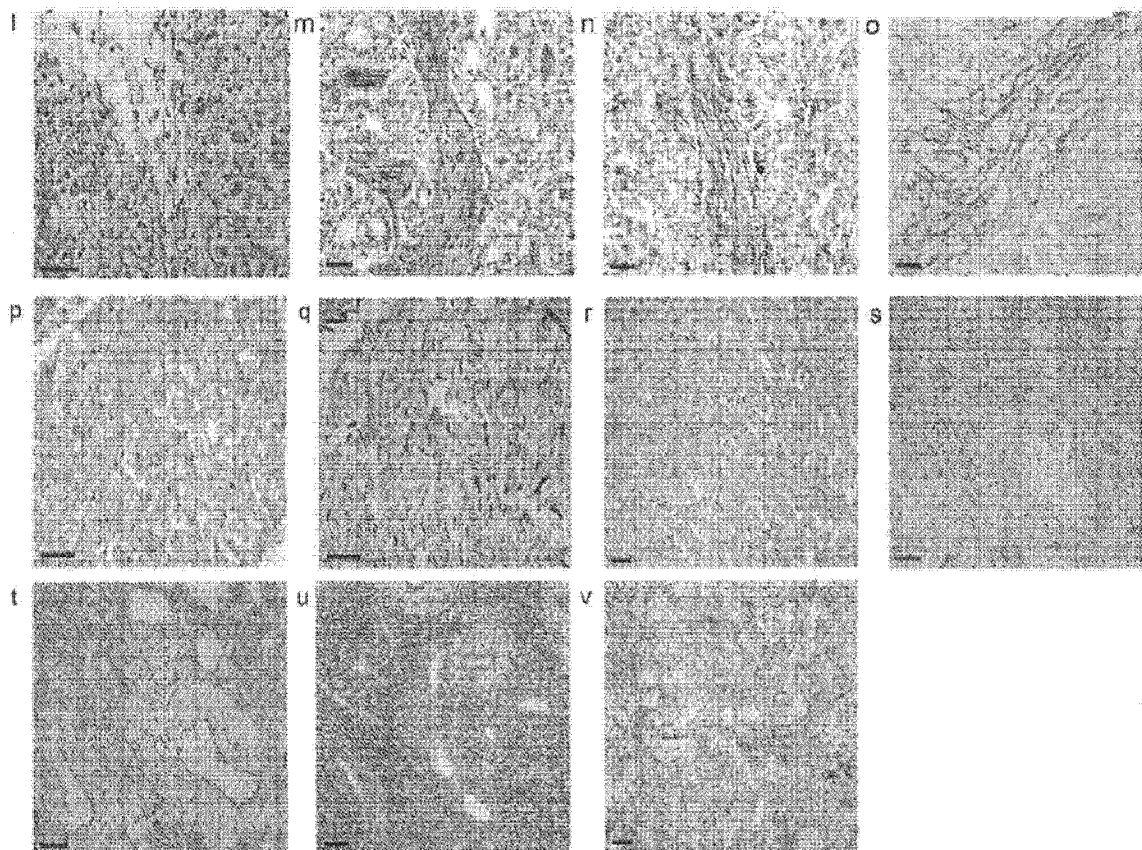


表 1

人体康组织	
心	弱/不表达
脑	弱/不表达
肝	弱表达
肺	弱/不表达
结肠	结缔组织中弱阳性
肾	一些阳性血管区域
胰腺	弱/不表达
乳腺	血管中弱阳性
小肠	结缔组织和粘膜层平滑肌中弱阳性，偶见血管中阳性表达
脾	在小叶梁网中阳性
卵巢	在血管和髓区阳性表达
子宫	在腺细胞和结缔组织细胞中阳性表达
皮肤	真皮中弱/无表达

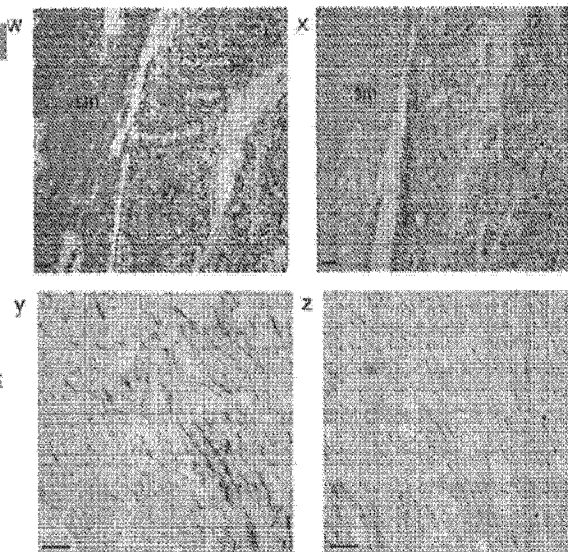
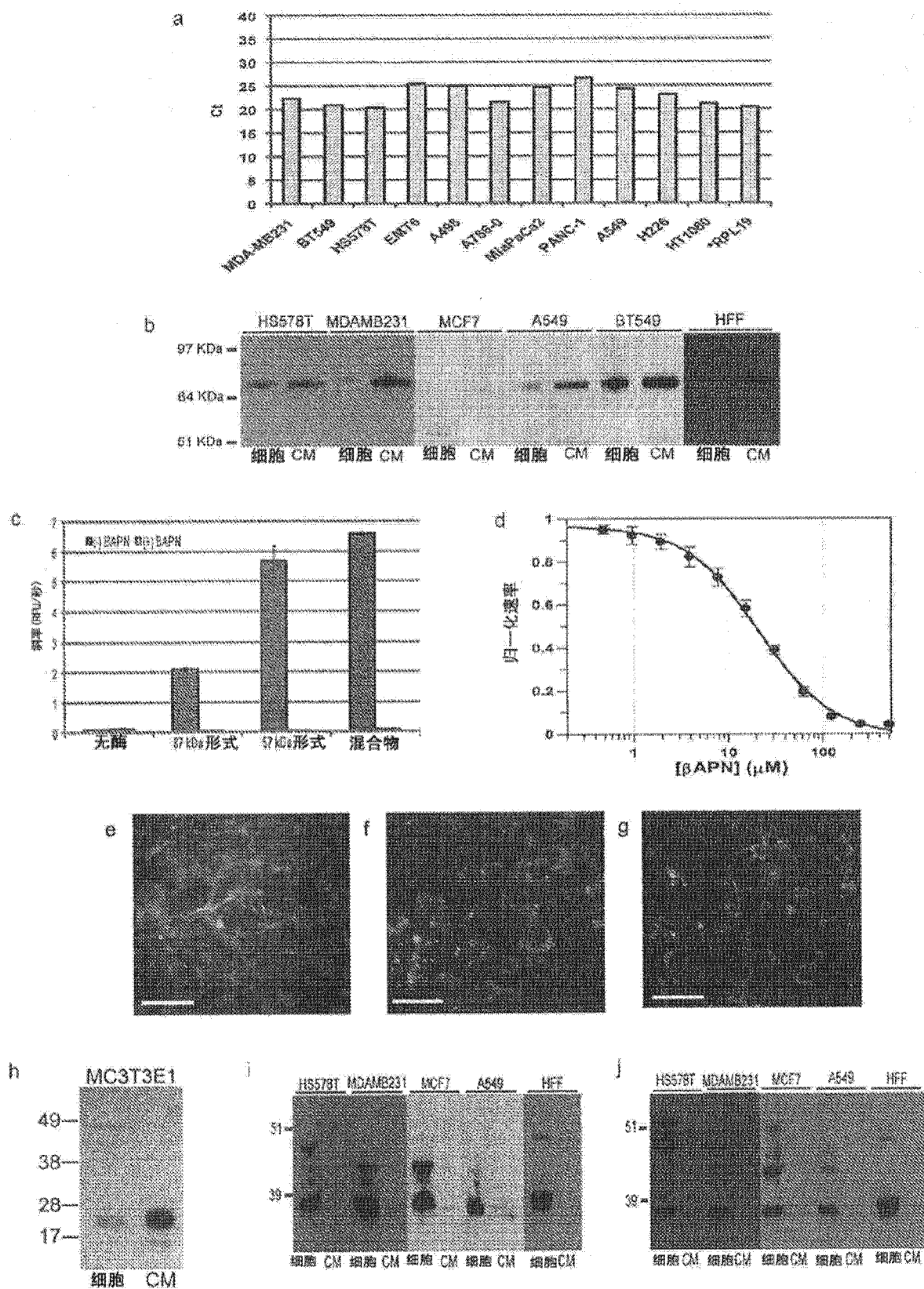


图 7



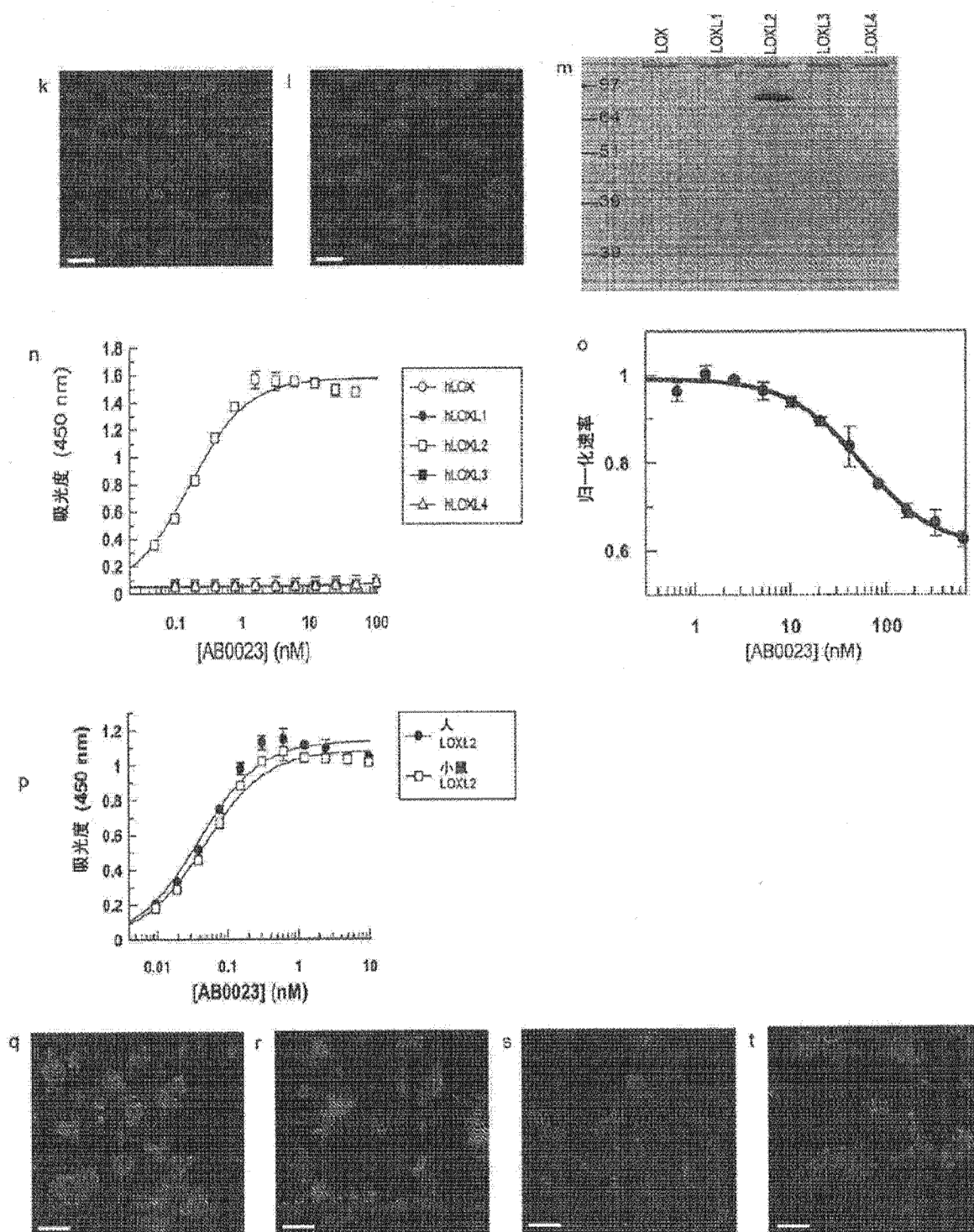


图 8

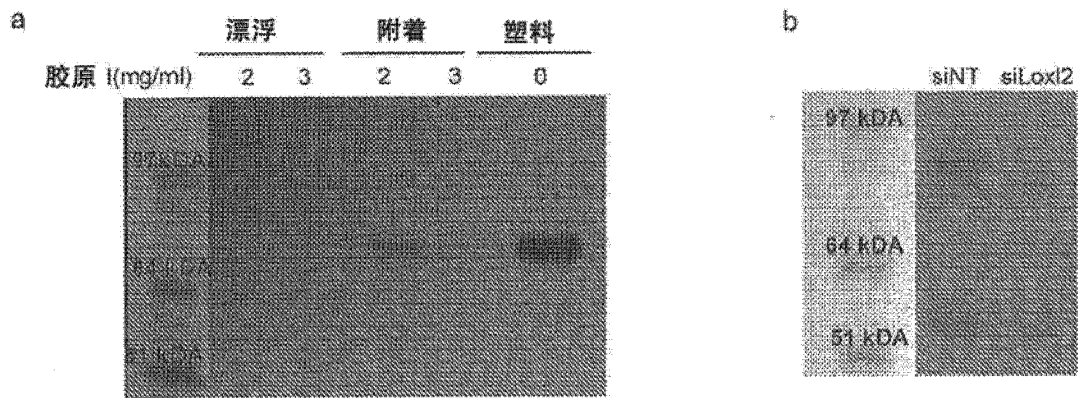


图 9

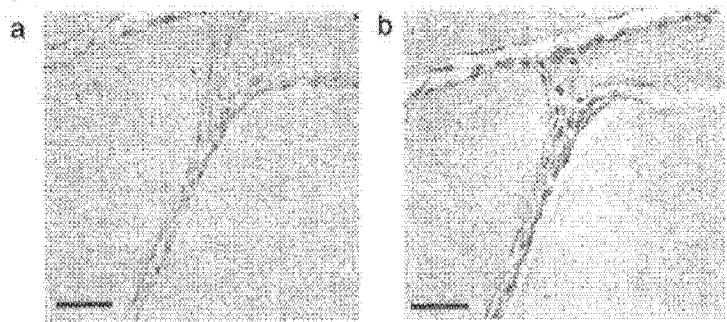


图 10

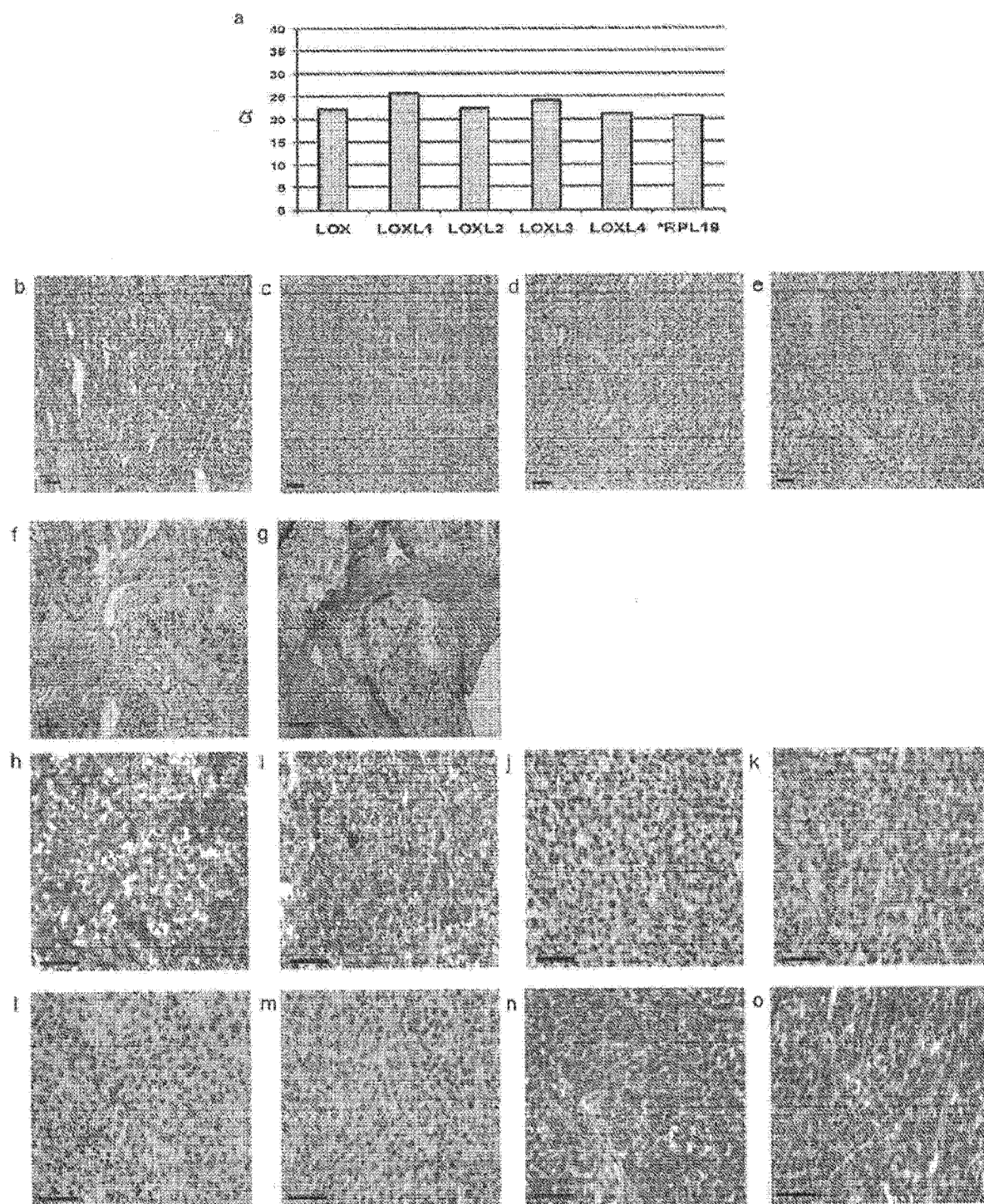


图 11

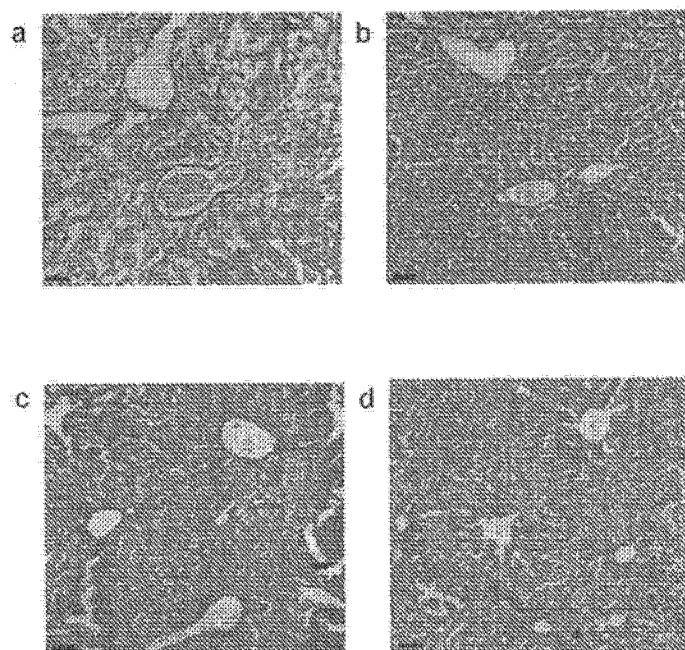


图 12