



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103505727 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 15

(21) 申请号 201210223311. 5

A61P 35/00(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 06. 28

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 阎锡蕴 姜天霞 罗永挺 段红霞

卢迪 杨东玲 冯静

(74) 专利代理机构 北京市汉信律师事务所

11373

代理人 王文生

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

靶向作为 VEGFR-2 共受体 CD146 的新功能在抗肿瘤血管新生治疗中的应用

(57) 摘要

靶向作为 VEGFR-2 共受体 CD146 的新功能在抗肿瘤血管新生治疗中的应用。本发明首次提出细胞黏附分子 CD146 是 VEGFR-2 的共受体, 抗 CD146 抗体与抗 VEGF 抗体联合应用于抑制肿瘤血管生成可能成为临床治疗癌症的新策略。与常规治疗肿瘤的靶向单一分子的抗体药物相比, 靶向两种不同分子的抗体联合能够更有效地抑制肿瘤生长。CD146 作为 VEGFR-2 的共受体能够辅助其更有效地传递 VEGF 介导的下游信号进而发挥促进血管生成功能。抗 CD146 抗体与抗 VEGF 抗体联合治疗肿瘤的作用机理主要是两种抗体联合能够共同抑制 VEGF-VEGFR-2 信号通路的活化、内皮细胞的迁移及血管生成等功能, 进而更加有效的抑制肿瘤生长(如胰腺癌等)。这两种抗体联合应用或与其他临床治疗手段相配合(如临床放疗)都将成为抑制肿瘤血管新生的新策略, 同时可用于肿瘤血管新生机理等基础研究。

1. 一种包含抗 CD146 抗体或所述抗 CD146 抗体的功能片段和抗 VEGF 抗体或所述抗 VEGF 抗体的功能片段的组合物,所述组合物用于抑制肿瘤血管新生,从而抑制肿瘤生长。
2. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述肿瘤是胰腺肿瘤。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的组合物,其中所述抗 CD146 抗体是抗 CD146 单克隆抗体 AA98,而所述抗 VEGF 抗体是贝伐单抗。
4. 根据权利要求 1 所述的组合物在制备用于抑制肿瘤生长的药物中的用途。
5. 根据权利要求 4 所述的用途,其中所述肿瘤是胰腺肿瘤。
6. 根据权利要求 4 或权利要求 5 所述的用途,其中所述抗 CD146 抗体是抗 CD146 单克隆抗体 AA98,而所述抗 VEGF 抗体是贝伐单抗。

靶向作为 VEGFR-2 共受体 CD146 的新功能在抗肿瘤血管新生治疗中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及用于治疗肿瘤的组合物。具体地,本发明涉及抗 CD146 抗体与抗 VEGF 抗体的组合物,其可用于治疗肿瘤。更具体地,本发明涉及的抗 CD146 的单克隆抗体 AA98 或其功能片段与抗 VEGF 的单克隆抗体贝伐单抗或其功能片段的组合物能够共同抑制 VEGF-VEGFR-2 信号通路的活化及其引起的内皮细胞的迁移及血管生成等功能,从而更加有效地抑制肿瘤生长,更具体地抑制胰腺肿瘤。

背景技术

[0002] 癌症是当前危害人类生命健康的头号杀手。我国每年恶性肿瘤的发病人数约 260 万。死于癌症者占死亡总人数的 20% 以上,居城市居民死亡原因的第一位(根据 2005 年统计资料)。

[0003] 目前,在肿瘤三大常规<放疗,化疗和手术>治疗中,药物治疗是一个重要方面。目前影响肿瘤药物治疗效果的因素是多方面的,包括药物的特异性、运输方式、渗透性以及诱发肿瘤耐药性。其中药物的特异性和耐药性是肿瘤治疗学急需解决的关键问题。抗肿瘤血管治疗以其肿瘤特异性、广谱性、无或低耐药性等优势已成为肿瘤治疗中的一种重要手段。其理论依据主要是上世纪七十年代 Folkman 提出的血管生成的概念,即新生血管为肿瘤提供营养和氧供应,进而促进肿瘤的生长及转移。

[0004] 大量研究发现,与肿瘤血管生成有关的因子已有 30 余种,如血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF),转化生长因子 (transforming growth factor-, TNF),成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF),肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF),促血管生成素 (angiopoietins) 等。其中,VEGF 被证实是最主要的直接作用于血管生成的高度特异性的生长因子。肿瘤细胞能合成并周期性分泌 VEGF 所分泌的 VEGF 与血管内皮细胞上的 VEGF 受体 (VEGFRs) 相结合,从而促进肿瘤血管生成。VEGF 促血管生成的信号转导主要通过其与 VEGFR-2 的结合来实现的。目前上市的抗血管生成药物大多都是以这些信号转导通路中的关键信号分子作为药物靶点而设计的,如抗 VEGF 的单克隆抗体贝伐单抗 (Bevacizumab, Roche 公司),抗 VEGFR-2 的单克隆抗体 DC101 等。与此同时,研究发现 VEGFR-2 存在共受体,例如 CD44,它能够与 VEGFR-2 相互作用,作为其共受体调节 VEGFR-2 介导的血管生成过程。因此,靶向此类共受体也能够有效地抑制肿瘤的血管生成进而抑制肿瘤生长。

[0005] 与此同时,靶向肿瘤血管的抗体免疫治疗中仍存在一些问题及瓶颈,如抗体治疗往往不能彻底杀死全部肿瘤细胞,剩余细胞容易在停药后复发。并且,单一靶点的抗体治疗具有局限性,不能够达到有效地治疗效果。因此寻找新的治疗靶标并且发现更有效的治疗策略是亟待解决的问题。

发明内容

[0006] 本发明首次提出 CD146 是 VEGFR-2 的共受体,抗 CD146 的单克隆抗体 AA98 与抗 VEGF 的单克隆抗体贝伐单抗 (Bevacizumab, Roche 公司) 的组合物可以作为治疗肿瘤的新型靶向药物。在动物肿瘤模型中 (如人胰腺癌),与单一一种抗体药物治疗肿瘤相比较,AA98 与贝伐单抗的组合物可以更加有效地抑制肿瘤血管生成进而抑制肿瘤生长。

[0007] 抗 CD146 抗体 AA98 与贝伐单抗抗体联合在抗肿瘤治疗中的应用是基于以下重要的科学发现:(1)CD146 与 VEGFR-2 相互作用,是 VEGFR-2 的共受体;(2)抗 CD146 单克隆抗体 AA98 能够阻断 CD146 与 VEGFR-2 之间的相互作用,进而阻断 VEGF 刺激引起的 VEGFR-2 的活化及下游信号 (Akt 和 p38/NF- κ B) 的激活;(3)抗 CD146 单克隆抗体 AA98 抑制由 VEGF 诱导的内皮细胞的迁移及血管生成;(4)裸鼠荷瘤模型中 (人胰腺癌细胞系 SW1990),AA98 与贝伐单抗联合用药更有效地抑制肿瘤血管生成进而抑制肿瘤生长。

[0008] 综上所述,CD146 作为 VEGFR-2 的共受体能够调节并辅助 VEGF-VEGFR-2 信号的传递,进而影响内皮细胞的迁移及血管生成。相对于 AA98 或贝伐单抗单独用药,我们自主研发的抗 CD146 功能性抗体 AA98 与贝伐单抗联合用药在裸鼠荷瘤模型中能够更加显著地抑制肿瘤血管生成进而抑制肿瘤生长。因此,我们提出靶向作为 VEGFR-2 的共受体 CD146 能够更加有效地抑制肿瘤生长,抗 CD146 的单克隆抗体 AA98 与贝伐单抗的药物组合物是治疗肿瘤的新型靶向药物。AA98 可以通过抑制 VEGFR-2 与 CD146 之间的相互作用,抑制 VEGF 引起的信号通路的激活,进而阻断血管生成,切断肿瘤的养分供应,从而抑制肿瘤生长。AA98 与贝伐单抗联合能够更加有效地切断决定肿瘤生长的信号通路的活化,更加显著的抑制肿瘤的生长。

[0009] 具体地,本发明提供以下各项:

[0010] 1. 一种包含抗 CD146 抗体或所述抗 CD146 抗体的功能片段和抗 VEGF 抗体或所述抗 VEGF 抗体的功能片段的组合物,所述组合物用于抑制肿瘤血管新生,从而抑制肿瘤生长。

[0011] 2. 根据第 1 项所述的组合物,其中所述肿瘤是胰腺肿瘤。

[0012] 3. 根据第 1 项或第 2 项所述的组合物,其中所述抗 CD146 抗体是抗 CD146 单克隆抗体 AA98,而所述抗 VEGF 抗体是贝伐单抗。

[0013] 4. 根据第 1 项所述的组合物在制备用于抑制肿瘤生长的药物中的用途。

[0014] 5. 根据第 4 项所述的用途,其中所述肿瘤是胰腺肿瘤。

[0015] 6. 根据第 4 项或第 5 项所述的用途,其中所述抗 CD146 抗体是抗 CD146 单克隆抗体 AA98,而所述抗 VEGF 抗体是贝伐单抗。

[0016] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明。

附图说明

[0017] 从下面结合附图的详细描述中,本发明的上述特征和优点将更明显,其中:

[0018] 图 1. CD146 与 VEGFR-2 在分子水平相互作用。A, 人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 中,免疫共沉淀方法发现 CD146 与 VEGFR-2 相互作用;B, HEK293T 中,免疫共沉淀方法验证 CD146 与 VEGFR-2 之间的相互作用;C, 体外 pull-down 实验发现 CD146 的胞外区与 VEGFR-2 胞外区存在直接相互作用;

[0019] 图 2. 抗 CD146 单克隆抗体 AA98 通过阻断 CD146 与 VEGFR-2 之间的相互作用 (A),

阻断 VEGF 诱导的 VEGFR-2 信号通路的活化 (B-F) ;

[0020] 图 3. 在体外水平, AA98 抑制 VEGF 诱导的内皮细胞迁移 (A) 及血管生成 (B) ;

[0021] 图 4. 荷瘤小鼠模型中, 与 AA98 或贝伐单抗单独给药组比较, AA98 与贝伐单抗联合用药能够更加有效地抑制肿瘤生长。(A) 不同给药组肿瘤大小示意图 ;(B) 相比较于 AA98 或贝伐单抗单独给药, AA98 与贝伐单抗联合给药能够更加有效地抑制肿瘤的大小 ;(C) 相比较于 AA98 或贝伐单抗单独给药, AA98 与贝伐单抗联合给药能够更加有效地抑制肿瘤的重量 ;(D) 相比较于 AA98 或贝伐单抗单独给药, AA98 与贝伐单抗联合给药能够更加有效地抑制肿瘤血管生成。

具体实施方式

[0022] 本说明书中使用的抗体 AA98 (Yan, X 等 A novel anti-CD146 monoclonal antibody, AA98, inhibits angiogenesis and tumor growth. Blood. 2003 ;102(1) : 184-191.)、AA1 (本实验室自主生产, 保藏机构 : 中国普通微生物保藏中心 ; 保藏号 : CGMCC No. 2310 ; 保藏日期 : 2007. 12. 28) 等可分别根据中国专利申请号 99107586. 2 (CN1234405)、中国专利申请号 200810057260. 7 (CN101245101) 的描述获得。贝伐单抗 (Bevacizumab) 购自 Roche 公司。

[0023] 实施例一 : 细胞水平, CD146 与 VEGFR-2 相互作用 ;

[0024] CD146 与 VEGFR-2 两者均是内皮细胞的标志物, 并且是血管生成过程中起关键作用的分子, 但是两者的联系并不清楚。为了研究两者之间的关系, 我们在细胞水平, 利用免疫共沉淀等方法证实, CD146 与 VEGFR-2 存在相互作用。抗 CD146 单克隆抗体 AA98 能够阻断 CD146 与 VEGFR-2 之间的相互作用。

[0025] 主要材料 : 人脐静脉内皮细胞系 (HUVECs) (ATCC, CRL-1730), 稳定转染 CD146cDNA 的 HEK293T 细胞系 (ATCC, CRL-11268) (HEK293T/CD146) 等。

[0026] 主要试剂 : 细胞裂解液, PBS, 鼠源抗 CD146 单克隆抗体 AA1 (本实验室自主生产。保藏机构 : 中国普通微生物保藏中心 ; 保藏号 : CGMCC No. 2310 ; 保藏日期 : 2007. 12. 28), 兔抗 VEGFR-2 抗体 (购自 Cell Signaling Technology 公司, 货号 #2479), His-sCD146 蛋白 (购自 Sino Biological Inc., 货号 50794-M08H), Fc-VEGFR-2 蛋白 (购自 Sino Biological Inc., 货号 10012-H02H), Fc 蛋白 (购自 Sino Biological Inc., 货号 10702-HNAH), VEGF 蛋白 (购自 Upstate Biotechnology 公司, 货号 B500014)。

[0027] 主要方法 : 免疫共沉淀及体外 pull-down 实验, 具体方法如下 :

[0028] 免疫共沉淀 :

[0029] 1) 将 1×10^7 /ml 的人脐静脉内皮细胞或经过瞬时转染 VEGFR-2 质粒 (10 μ g) (Lena Claesson-Welsh et al. EMBO J. 2005 July 6 ; 24(13) : 2342-2353.) 的 HEK293T/CD146 接种于 100mm 培养皿中, 当细胞密度达到 90% 后将细胞轻轻刮下, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟离心收集于 Ep 管中。

[0030] 2) 加入 600 μ l 裂解液 RIPA Buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM Na₃VO₄, 1mM NaF, 1mM PMSF 和 1mM proteinase inhibitors cocktails (蛋白酶抑制剂, 购自 Roche 公司, 货号 04693116001)), 冰上裂解 30 分钟, 4 $^{\circ}$ C 离心 (12,000g) 15 分钟。

[0031] 3) 吸取上清为细胞裂解液,经 Bradford 法测定蛋白浓度之后,将总蛋白浓度稀释至 1mg/ml。

[0032] 4) 在裂解液中加入 20 μ l protein G-Agarose,4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时,去除与 20 μ l protein G-Agarose 非特异结合的蛋白质。

[0033] 5) 离心取上清,加入 2 μ g 的 CD146 单克隆抗体 AA1 或兔抗 VEGFR-2 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。

[0034] 6) 再次加入 50 μ l protein G-Agarose,4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。

[0035] 7) 离心弃上清,沉淀的 agarose beads 用含蛋白酶抑制剂的 PBS 洗 3 次,每次 5 分钟后加入上样缓冲液 100 μ l 涡旋 2 分钟,100 $^{\circ}$ C 煮 10 分钟,离心取上清。

[0036] 8) 处理好的蛋白样品及全细胞裂解液留样一起用于 Western blot 检测。

[0037] 体外 pull-down 实验:

[0038] 1) 将 Fc-VEGFR-2 蛋白 200ng 或 Fc 蛋白 200ng 与 His-CD146 蛋白 200ng 一起融于 500 μ l PBS 的 EP 管中,4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。

[0039] 2) 加入 20 μ l protein G beads,4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。

[0040] 3) 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟,弃上清,沉淀的 agarose beads 用含蛋白酶抑制剂的 PBS 洗 3 次,每次 5 分钟后,加入上样缓冲液 50 μ l 涡旋 2 分钟,100 $^{\circ}$ C 煮 10 分钟。

[0041] 4) 处理好的蛋白样品用于 Western blot 检测。

[0042] 结果如图 1 显示,在 HUVECs (A) 中,用抗 CD146 抗体 AA1 捕获 CD146 的同时可以结合 VEGFR-2,反之亦然,说明 CD146 与 VEGFR-2 存在相互作用。在 HEK293T/CD146 (B) 中,转染 VEGFR-2 的细胞中,兔抗 VEGFR-2 的抗体可以同时捕获 VEGFR-2 与 CD146,但在只表达 CD146 的细胞中,Western blot 的结果中检测不到 CD146,此结果验证了 A 的结论,即 CD146 与 VEGFR-2 存在相互作用。在体外 pull-down 实验中,如 (C) 所示,CD146 与 VEGFR-2 之间存在直接相互作用。另外,利用抗 CD146 单克隆抗体 AA98 或 AA1 (100 μ g/ml) 分别孵育 HUVECs,37 $^{\circ}$ C 1 小时后,用细胞培养基清洗三遍,将以上经过处理的细胞用于免疫共沉淀实验,如 (D) 所示,在 HUVECs 中,抗 CD146 单克隆抗体 AA98 能够阻断内源的 CD146 与 VEGFR-2 之间的相互作用。以上结果说明内皮细胞中 CD146 与 VEGFR-2 直接相互作用,抗 CD146 单克隆抗体 AA98 能够阻断两者之间的相互作用。

[0043] 实施例二:抗 CD146 抗体通过阻断 CD146 与 VEGFR-2 之间的相互作用,阻断 VEGF 刺激引起的 VEGFR-2 信号通路的活化;

[0044] 粘附分子 CD146 在血管生成过程中具有关键作用。作为 VEGFR-2 的共受体,CD146 调节 VEGFR-2 信号通路。抗 CD146 单克隆抗体 AA98 能够阻断 CD146 与 VEGFR-2 之间的相互作用,进而阻断 VEGF 刺激引起的 VEGFR-2 信号通路的活化。

[0045] 利用抗 CD146 单克隆抗体 AA98 或 AA1 (100 μ g/ml) 分别孵育 HUVECs,37 $^{\circ}$ C 1 小时后,用细胞培养基清洗三遍后,再用 VEGF (50ng/ml) 刺激后裂解细胞用于生化分析信号通路。如图 2 (A) 所示,在 HUVECs 中,AA98 能够阻断内源的 CD146 与 VEGFR-2 之间的相互作用。如 (B-F) 所示,VEGF 刺激 (5 分钟) 能够引起 VEGFR-2 的磷酸化,以及下游信号分子,如 Akt (15 分钟),p38 (15 分钟),NF- κ B (10 小时) 的活化。AA98 能够阻断由 VEGF 刺激引起的 VEGFR-2 及下游分子 Akt,p38,NF- κ B 的活化。说明 CD146 能够参与并调节 VEGF-VEGFR-2 信号通路活化。

[0046] 实施例三:抗 CD146 抗体抑制 VEGF 刺激引起的内皮细胞的迁移及血管生成能力;
[0047] 血管生成主要为肿瘤提供养分,并为肿瘤细胞转移的提供途径,因此对于肿瘤的生长起到至关重要的作用。抑制血管生成就能够很大程度的抑制肿瘤的生长。VEGF 是肿瘤细胞分泌的主要细胞因子,其介导的信号通路最终决定肿瘤血管生成。CD146 参与并调节 VEGF-VEGFR-2 信号通路,抗 CD146 的抗体抑制 VEGF 刺激引起的内皮细胞的迁移及血管生成。

[0048] 主要材料:人脐静脉内皮细胞系,96 孔 Transwell 板 (Corning HTS Transwell-96 Cell Migration Products) 等。

[0049] 主要试剂:VEGF (购自 Upstate Biotechnology 公司,货号 B500014),抗 CD146 抗体 AA98、AA1,鼠 IgG (mIgG,购自 Sigma-Aldrich 公司,货号 I5381),Matrigel (不含生长因子, BD Biosciences, 货号 354234)。

[0050] 主要方法:细胞迁移实验,内皮细胞成血管实验。具体方法如下:

[0051] 细胞迁移实验:

[0052] 1) HUVECs 细胞以完全培养基重悬,制成单细胞悬液 (1×10^5 /ml)。

[0053] 2) Transwell 下室加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基 (购自 Gibco, 货号 31800-022) ($200 \mu\text{l}$ /孔),上室加入细胞悬液 ($100 \mu\text{l}$ /孔,每种处理设三个平行孔),

[0054] 3) 向上室的细胞中加入抗体 AA98 或 AA1 ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) 与刺激剂 VEGF ($100\text{ng}/\text{ml}$)。在 37°C 二氧化碳培养箱中孵育过夜。

[0055] 4) 将膜上层的细胞用棉签擦掉,用镊子将 96 孔 transwell 板的膜揭下,膜下层朝上放于载玻片上。

[0056] 5) 下层细胞以 4% 多聚甲醛室温固定 15 分钟后,用 1% 结晶紫染色 15 分钟,镜检记录每个视野下的细胞数量。

[0057] 内皮细胞成血管实验是在 Nagata 等人建立的实验方法的基础上改进而来,具体操作如下:

[0058] 1) HUVECs 细胞以完全培养基重悬,制成单细胞悬液 (1×10^5 /ml)。

[0059] 2) 在 96 孔板中包被冰浴的 Matrigel ($50 \mu\text{l}$ /孔), 37°C 固化 30 分钟。

[0060] 3) 向每个孔中加入 $100 \mu\text{l}$ 细胞悬液,同时相应地加入刺激剂 VEGF ($100\text{ng}/\text{ml}$) 及抗体 AA98 或 AA1 ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)。

[0061] 4) 37°C 培养箱中孵育过夜,之后在倒置显微镜下观察,拍照。

[0062] 实验结果如图 3(A) 所示, VEGF 能够增加内皮细胞的迁移能力及,与 AA1 对照组相比,抗 CD146 抗体 AA98 能明显降低 VEGF 刺激所引起的内皮细胞的迁移力,抑制率约为 53%。同样的,用 VEGF 刺激 HUVECs 可以促进 HUVECs 形成血管样结构。然而,相对于 AA1 处理组,AA98 明显地抑制 VEGF 刺激所引起的内皮细胞的血管生成能力。以上结果证实,CD146 对于 VEGFR-2 所介导的血管生成过程是必须的。

[0063] 实施例四:在裸鼠荷瘤模型中,与单独的 AA98 或贝伐单抗相比较,AA98 与贝伐单抗的组合物能够更加显著地抑制人胰腺癌肿瘤血管生成进而抑制肿瘤生长。

[0064] 在肿瘤的发生发展过程中,血管生成成为肿瘤提供养分,并为肿瘤细胞转移的提供途径。目前靶向肿瘤血管生成已经成为临床上治疗肿瘤的主要策略之一。动物实验证实,AA98 与贝伐单抗联合用药能够更加有效地抑制肿瘤生长。

[0065] 实验方法:选择 60 只 4 周大小雌性的 BalB/C 裸鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司),随机分为 6 组以分别给予不同的抗体进行治疗,每组 10 只。分别在背部皮下注射 1×10^7 个人胰腺癌细胞系 SW1990 细胞(ATCC,CRL-2172)(重悬在 $100 \mu\text{l}$ PBS 中)。待肿瘤体积达到 0.06cm^3 ,开始腹腔注射抗体,分别为 mIgG(购自 Sigma-Aldrich 公司,货号 I5381; $200 \mu\text{g}/\text{只}$), hIgG(购自中杉金桥,货号 ZDR-5001; $200 \mu\text{g}/\text{只}$), AA1($200 \mu\text{g}/\text{只}$), AA98($200 \mu\text{g}/\text{只}$), 贝伐单抗(购自 Roche 公司; $200 \mu\text{g}/\text{只}$), AA98+ 贝伐单抗(AA98 和贝伐单抗分别 $200 \mu\text{g}/\text{只}$, 共计 $400 \mu\text{g}/\text{只}$),每周 2 次,测量肿瘤的长、宽,以便计算肿瘤体积。4 周后脱颈法处死所有小鼠,剥离肿瘤。将肿瘤称重后,用 4% PFA 固定 24 小时,石蜡包埋,切片,免疫组化分析。以下为石蜡切片的免疫组化过程:

[0066] 1) 取出片子,入二甲苯溶液 37°C 脱蜡两次,每次 30 分钟;

[0067] 2) 入无水乙醇 $\times 2-95\%-80\%-70\%-50\%-30\%$ 和蒸馏水中水化,室温每次 5 分钟;

[0068] 3) 0.3% 过氧化氢 / 甲醇溶液 37°C 避光处理 30 分钟,消除内源性过氧化物酶的活性, PBS 洗三次;

[0069] 4) pH6.0 柠檬酸修复液 100°C 水浴 30 分钟抗原热修复,自然冷却;

[0070] 5) 5% 的正常羊血清(购自中杉金桥公司,货号 ZLI-9021) 37°C 封闭 1 小时;

[0071] 6) 加入 PBS 稀释的一抗(兔抗 CD31 多抗,购自 Abcam 公司,货号 ab28364; $1:50$ 稀释), 4°C 孵育过夜;

[0072] 7) PBS 洗三次;山羊抗-兔-生物素(购自中杉金桥公司,货号 ZB-2010; $1:1000$ 稀释)在 37°C 孵育 1 小时, PBS 洗三次;

[0073] 8) 亲和素-HRP(购自 Hyclone-pierce 公司,货号 N100; $1:1000$) 在 37°C 孵育 45 分钟;

[0074] 9) 现配的 DAB(购自中杉金桥公司,货号 ZLI-9032; $1:1000$ 稀释) 避光显色 2-7 分钟,苏木素复染。

[0075] 10) 逐级脱水: $50-70-80-90-100-100\%$ 乙醇-二甲苯,晾干,中性树脂封片。

[0076] 11) 显微成像系统中拍片。

[0077] 结果显示,如图 4 所示,AA98 与贝伐单抗组合物实验组中,组合物对于肿瘤生长的抑制效果更明显。与对照组(mIgG 或 hIgG 组)相比较,组合物对于肿瘤体积的抑制百分比为 70% ,而单独的 AA98 或贝伐单抗的抑制率只有 46% 或 48% 。经过 AA98 与贝伐单抗的组合物处理的肿瘤的血管密度更少,分别为 AA98 或贝伐单抗单独用药组的血管密度的 40% 或 30% 。以上结果说明,AA98 与贝伐单抗的组合物能够更有效地抑制肿瘤血管生成进而抑制肿瘤生长。

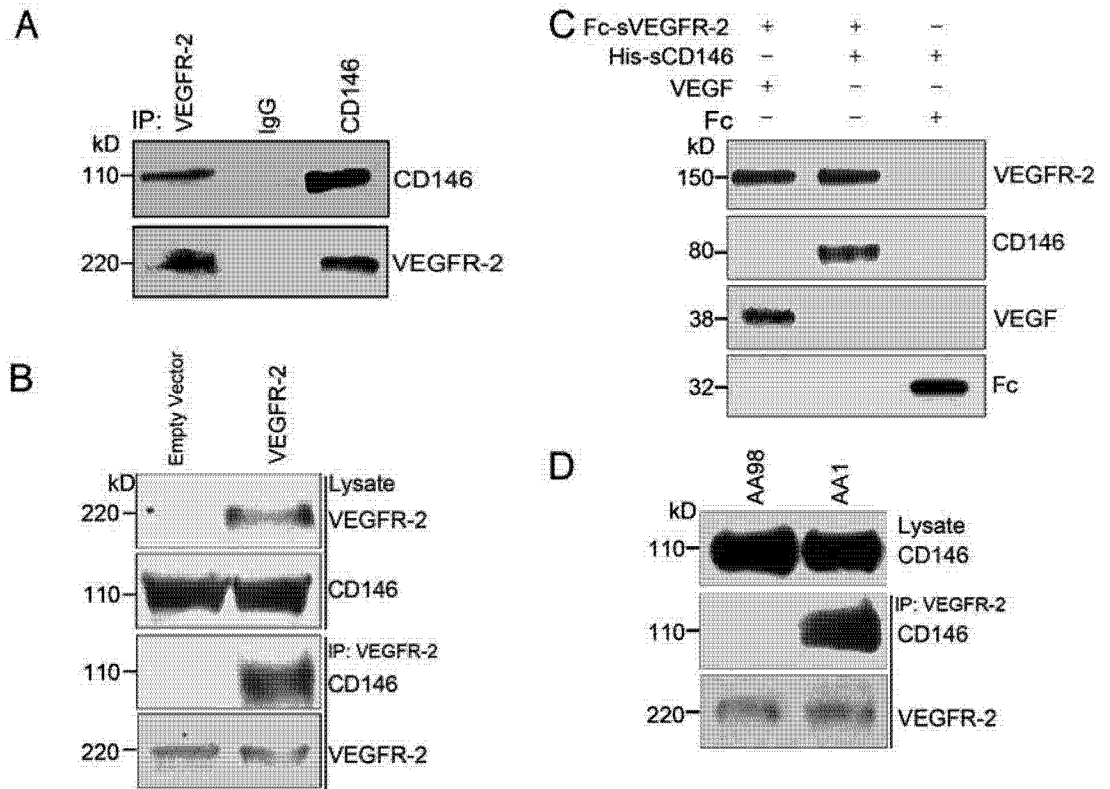


图 1

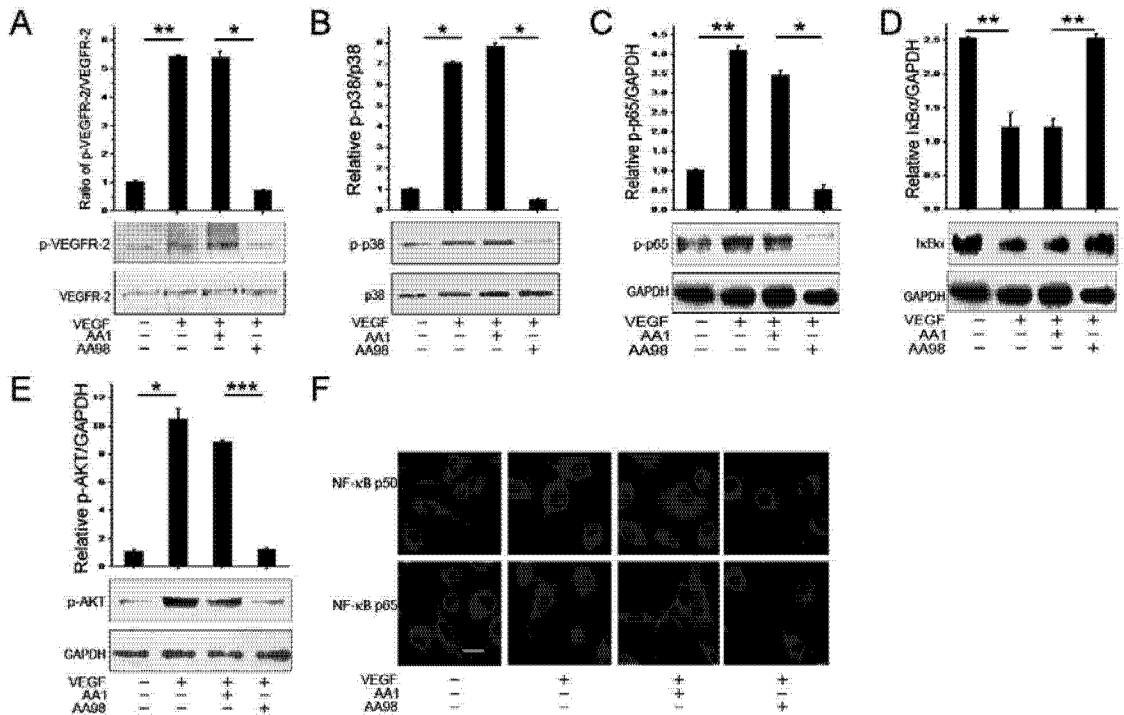


图 2

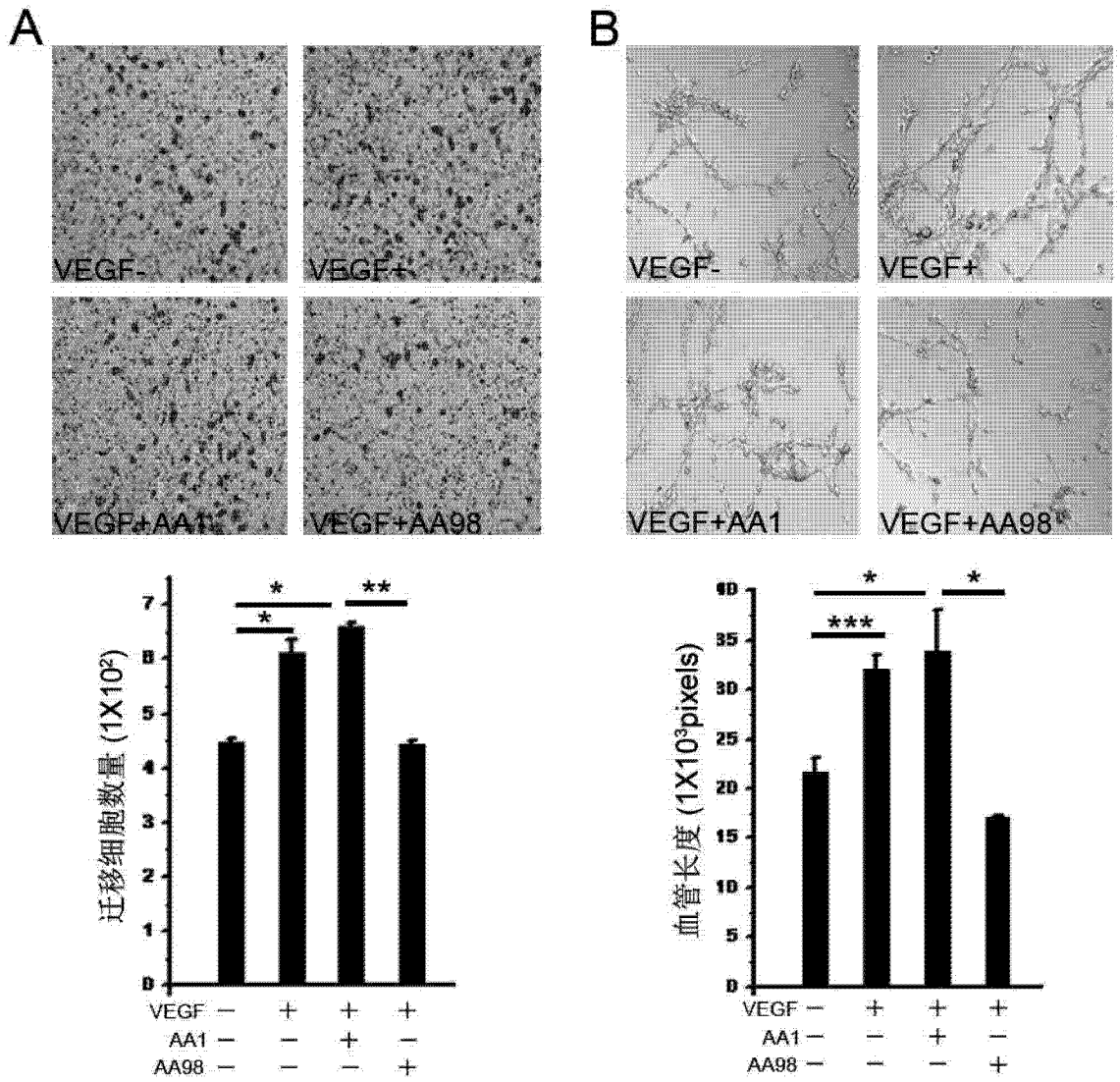


图 3

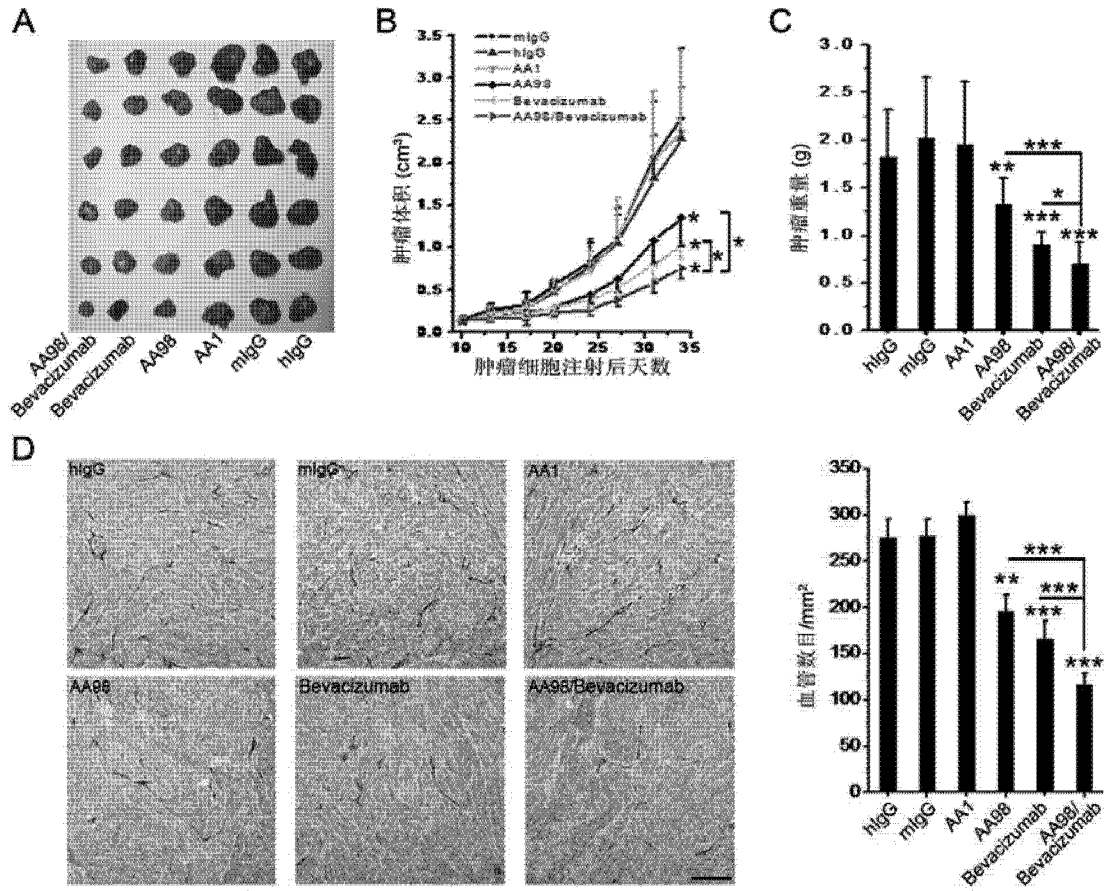


图 4