



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103003308 B

(45)授权公告日 2016.08.10

(21)申请号 201180034613.1

(22)申请日 2011.07.13

(30)优先权数据

1011771.1 2010.07.13 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.01.14

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/061983 2011.07.13

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/007516 EN 2012.01.19

(73)专利权人 生物发明国际公司

地址 瑞典隆德

(72)发明人 玛尔库斯·翰松

比约恩·弗伦多斯

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

代理人 吴小瑛 营兴成

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

(56)对比文件

CN 101360760 A, 2009.02.04,

LACY MARTHA Q 等.Phase I,

pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the anti-insulinlike growth factor

type 1 Receptor monoclonal antibody CP-

751,871 in patients with multiple

myeloma.《JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY》

.2008,第26卷(第19期),3196-3203.

审查员 王慧

权利要求书1页 说明书41页

序列表4页 附图25页

### (54)发明名称

抗ICAM-1抗体在治疗患有复发性癌症的患者中的用途

### (57)摘要

本发明提供了对ICAM-1具有结合特异性的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段用于治疗患者的癌症,其中所述患者先前已经进行过所述癌症的治疗,但对所述治疗无响应或者对所述治疗先是有响应而之后复发。



1. 对ICAM-1具有结合特异性的抗体或其抗原结合片段,或对ICAM-1具有结合特异性的所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或化学衍生物,或所述变体或化学衍生物的融合物在制备治疗患者癌症的药物中的用途,其中所述患者先前已经进行过所述癌症的治疗,但对所述治疗无响应或者对所述治疗先是有响应而之后复发,其中所述抗体或其抗原结合片段,或对ICAM-1具有结合特异性的所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或化学衍生物,或所述变体或化学衍生物的融合物包含作为VH区的氨基酸序列SEQ ID NO.8和作为VL区的SEQ ID NO.10,并且其中待治疗的所述癌症是淋巴增生性疾病。

2. 如权利要求1所述的用途,其中,待治疗的所述癌症与所述患者先前治疗过的癌症相同。

3. 如权利要求1所述的用途,其中,待治疗的所述癌症与所述患者先前治疗过的癌症不同。

4. 如权利要求1-3任一项所述的用途,其中,待治疗的所述癌症是多发性骨髓瘤。

5. 如权利要求1-3任一项所述的用途,其中,ICAM-1位于浆细胞表面。

6. 如权利要求1-3任一项所述的用途,其中,所述抗体、抗原结合片段、或所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或化学衍生物的有效量为0.1 $\mu$ g至5g的所述抗体、抗原结合片段、变体、融合物或化学衍生物。

7. 如权利要求1-3任一项所述的用途,其中,所述抗体或抗原结合片段、或所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或化学衍生物包含完整抗体或由完整抗体组成。

8. 如权利要求1-3任一项所述的用途,其中,所述抗体或抗原结合片段、或所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或化学衍生物包含选自Fv片段、Fab片段、Fab样片段中的抗原结合片段或由选自Fv片段、Fab片段、Fab样片段中的抗原结合片段组成。

9. 如权利要求8所述的用途,其中,所述Fv片段是单链Fv片段或具有二硫键的Fv片段。

10. 如权利要求8所述的用途,其中,所述Fab样片段是Fab'片段或F(ab)<sub>2</sub>片段。

11. 如权利要求1-3任一项所述的用途,其中,所述抗体是重组抗体。

12. 如权利要求1-3任一项所述的用途,其中,所述抗体是单克隆抗体。

13. 如权利要求1-3任一项所述的用途,其中,所述抗体或其抗原结合片段是人抗体或人源化抗体。

## 抗ICAM-1抗体在治疗患有复发性癌症的患者中的用途

### 背景技术

[0001] 多发性骨髓瘤(multiple myeloma,也称为MM或骨髓瘤)是一种B细胞的恶性肿瘤,占有血液恶性肿瘤的10%至20%。目前,它是一种诊断时中位年龄为65-70岁无法治愈的疾病,极少数患者在40岁之前被诊断出该疾病。多发性骨髓瘤在美国是第二大常见血液恶性肿瘤,世界范围内每100,000个体有4人发病。在美国,预计在2008年有19,920起多发性骨髓瘤新发病例和超过10,000起死亡病例与骨髓瘤有关(美国癌症学会,2008)。该病略微偏于男性,且在非裔美国人中多见,在亚裔群体中少见(Kyle & Rajkumar,Blood.2008Mar15;111(6):2962-72.综述)。

[0002] 骨髓瘤的诊断预后较差,当前治疗的中位生存时间为3至4年,但是即使采用最好的治疗,重症个体可能仅有2年的中位生存时间(Kyle & Rajkumar,Blood.2008Mar15;111(6):2962-72.综述)。

[0003] 骨髓瘤的典型临床现象是患者具有因病理性骨折的严重疼痛,特别是在胸廓或脊柱中(Kyle & Rajkumar,2004,N Engl J Med.2004Oct28;351(18):1860-73.综述)。其他常见特征是肾衰竭、高钙血症、具有贫血和血小板减少的骨髓缺乏,以及感染和诸如静脉血栓形成和肺栓塞的栓塞性并发症的风险增加。器官衰竭有时由免疫球蛋白轻链的纤维状聚集体病理性沉积(称为AL-淀粉样变性)引起。一旦出现,它通常涉及心脏和肾脏,分别导致严重的心律失常和/或心脏衰竭,和肾功能障碍与衰竭。

[0004] 多发性骨髓瘤的特征为其具有很大程度上未得到满足的医学需要-当前可获得的治疗多发性骨髓瘤的药物是非治愈性的,伴有显著的毒性,以及发生抗药性。多发性骨髓瘤浆细胞一般不表达CD20,或显示出低的异源性CD20表达,使得靶向CD20的治疗在该病中不太可能有效(Kapoor et al.Haematol,2008,141:135-248)。

[0005] 已经开发了一系列治疗患有多发性骨髓瘤的个体的方法,包括下列药物的应用:美法仑(Melfalan)(和其他烷化物,诸如环磷酰胺);其他化疗药(诸如阿霉素、长春新碱和顺铂);高剂量类固醇;干扰素;二膦酸盐(诸如帕米膦酸盐或唑来膦酸盐)。此外,还曾用过自体 and 同种异体的干细胞移植。

[0006] 尽管在开发治疗或预防多发性骨髓瘤的新型疗法上有了最新的进展,但那些药物对于患者生存时间和生活质量的实际益处还相当有限(Kumar et al,Blood,2008,111(5):2516-20)。而且,现有治疗与在相当数量患者中的严重副作用有关。例如,化疗导致感染敏感性增加、恶心、脱发和器官损伤;类固醇治疗可导致体重增加、糖尿病、感染敏感性增加、骨质疏松症和精神障碍;干扰素治疗可导致疲劳、发烧、肌肉疼痛和抑郁;并且二膦酸盐治疗很少但有时导致肾损伤和骨坏死。利用干细胞移植的手术伴随有显著的复发率和移植相关的发病率和死亡率。包括沙利沙利多胺(thalidomide)、硼替佐米(bortezomib)和来那度胺(lenalidomide)的新型骨髓瘤药也具有副作用,限制了其在许多患者中的使用。

[0007] 近些年,在理解多发性骨髓瘤的发病机理和分子机制上取得了显著进展。遗传学研究揭示,常带有预后相关性的大量不同染色体的改变与该病关联。简言之,这些染色体转位常涉及免疫球蛋白(Ig)H位点(14q32.3),并由Ig增强子促进将各种转化基因并置为片

段,导致了表达失调和潜在的恶性转化(Hideshima et al.Nat Rev Cancer.2007.7(8):585-598)。在骨髓瘤上用硼替佐米的蛋白酶体抑制的治疗作用首先是在体外的骨髓瘤细胞中得到证实,并且可能是直接的细胞毒性和粘附分子和各种生长因子、存活因子和血管生成因子的表达下降的结果(Kyle & Rajkumar N Engl J Med.2004Oct28;351(18):1860-73.综述)。由于其正常的调节蛋白I $\kappa$ B的蛋白酶体降解,转录因子NF $\kappa$ B在骨髓瘤中具有增强的活性,并且硼替佐米通过抑制蛋白酶体活性恢复了NF $\kappa$ B的动态平衡。

[0008] 由骨破骨细胞、内皮细胞、骨髓干细胞以及胞外基质蛋白组成的骨髓微环境在多发性骨髓瘤发病机理中具有重要的作用(Hideshima et al.,Nat Rev Cancer.2007.7(8):585-598),而且提供了介导恶性浆细胞的生长、存活和抗药性的因子。由骨髓瘤细胞表达的各种粘附分子(例如ICAM-1)对于这种相互作用至关重要。

[0009] 细胞间粘附因子-1(ICAM-1)高度表达,且参与多种类型的人恶性肿瘤的发病,包括骨髓瘤(Huang,et al.Hybridoma.1993.12(6):661-675;Huang et al.Cancer Res.1995.55(3):610-616;Smallshaw et al.Immunother1997.2004.27(6):419-424;Schmidmaier,Int J Biol Markers.2006.21(4):218-222)、黑素瘤(Wang et al.Int J Cancer.2006.118(4):932-941;Johnson et al.,Immunobiology.1988.178(3):275-284)、肺癌(Grothey et al.Br J Cancer.1998.77(5):801-807)、胃癌(Maruo et al.Int J Cancer.2002.100(4):486-490)、膀胱癌(Roche et al.Thromb Haemost.2003.89(6):1089-1097)、乳癌(Rosette C et al.Carcinogenesis.2005.26(5):943-950)、前列腺癌(Aalinkel R et al.Cancer Res2004.64(15):5311-21)和淋巴瘤(Horst et al.Leukemia.1991.5(10):848-853)。ICAM-1表达增加与发生药物诱导的抗性(Schmidmaier et al.Int J Biol Markers.2006.21(4):218-222)、肿瘤细胞侵袭(Miele et al.,Exp Cell Res214(1),2311994)和较差预后(Dowlati et al.,Clin Cancer Res14(5),1407(2008))有关。

[0010] 年轻患者(即年龄小于65岁)的骨髓瘤的标准治疗由用长春新碱-阿霉素-地塞米松调理然后用自体干细胞支持的高剂量美法仑调理组成。在前十年间,尽管该方案在仅有的少数患者的骨髓中实现了症状的完全缓解,但显示出延长了中位生存时间约1年(Harousseau JL.Hematology Am Soc Hematol Educ Program.2008;2008:306-12)。由于高剂量治疗所带来的风险,已经主要为老年患者提供低剂量美法仑联合强的松的治疗。

[0011] 近些年,已经批准了用于复发性骨髓瘤治疗的其他疗法。这些新药包括蛋白酶体抑制剂硼替佐米(万科(Velcade)®)和“免疫调节性”药,沙利多胺与来那度胺(雷利米得(Revlimid)®),在治疗选择中构成了显著的进步。使用此类药物的复发性骨髓瘤患者总体响应率通常在30%左右,但一般高于该药联合间断的地塞米松的情况。基于这些发现,与地塞米松和/或化疗联合用药的所述新药现在作为骨髓瘤的一线治疗正在临床试验中(<http://clinicaltrials.gov/ct2/search>),初步结果具有前景(American Society of Hematology,December6-9,2008)。

[0012] 尽管与传统疗法相比,硼替佐米、来那度胺和沙利多胺在复发性骨髓瘤患者中已显示出生存时间益处(Rajkumar Blood.2005.106(13):4050-4053;Richardson et al.Blood.2006.108(10):3458-3464;Richardson et al.N Engl J Med.2005.352(24):2487-2498;Singhal et al.N Engl J Med.1999.341(21):1565-1571),增加长期生存时间

或治愈的目标还没有达到。而且,所述的新药也有严重的副作用,例如血栓栓塞、神经病和免疫与骨髓抑制的风险的增加,限制了其在相当数量患者中的使用。

[0013] 尽管在开发新型疗法上有最新的进展,但这些药物对于患者生存时间和生活质量的实际益处还较为有限,多数患者要么没有响应,要么产生了抗药性并随后复发,因而有依据开发新型的、更有效和更高评价的治疗剂以抵抗多发性骨髓瘤。相应地,需要针对骨髓瘤治疗的新的潜在靶点和药物,特别是用于对现有药物不响应或起初响应但随后复发的患者。

[0014] 过去二十年来,靶向免疫疗法和基于抗体的药物的进展已显著改进了医生解决癌症和血液恶性肿瘤的手段(1)。在血液恶性肿瘤中,CD20特异性的小鼠人嵌合单克隆抗体利妥昔单抗(rituximab)提供了治疗性抗体的最佳示例,该抗体在用作单一疗法(2)(3)或联合传统化疗药物(4-6)时显著改善非霍奇金淋巴瘤患者的生存时间(7,8)。然而,由于肿瘤细胞CD20表达缺乏或对CD20具有天然或获得性抗性,患有血液病症的大部分患者仍不适合抗CD20治疗(9)。因而,亟需开发新一代具有针对这些当前无法治愈的癌症的活性的抗体,以改善临床效果。

[0015] 本发明申请人描述了靶向B11表位的新型人ICAM-1抗体,所述抗体比当前可获得的针对不同移植的表达CD20和CD20阴性的人B细胞肿瘤的体内治疗具有更广谱高功效和效力的抗肿瘤活性。基于其靶向肿瘤B细胞上调的表面受体和其竞争性的程序性细胞死亡所诱导的性质,所述ICAM-1B11抗体通过差别性生物淘选和程序性细胞死亡(PCD)筛选分离自天然抗体库n-CoDeR<sup>®</sup>(BioInvent)。据申请人所知,这是功能性筛选方法首次成功一方面用于鉴定先前良好表征的受体(ICAM-1)的新功能,且同时产生抗同一靶点具有如此显著治疗潜能的抗体。这种关于治疗性抗体探索的“功能第一方法(function-first-approach)”因此构成了重要的与利用针对重组靶蛋白或转染靶细胞的淘选的传统方法(其中所检索的抗体库受限于抗先前定义好的靶受体的特异性)互补的策略。

[0016] 申请人发现,与针对表达CD20的肿瘤的利妥昔单抗相比,IgG B11具有体内竞争性的抗肿瘤活性,而且在不同淋巴瘤类型中,ICAM-1的表达明显频繁,这表明它可应用于表达CD20的淋巴瘤的治疗。当单独或联合化疗使用时(8),利妥昔单抗总体上显著改善非霍奇金淋巴瘤(NHL)患者生存时间,然而患有复发性或顽固的CD20<sup>+</sup>滤泡淋巴瘤的大部分患者对起初的利妥昔单抗治疗不响应(2),而且超过一半的先前响应利妥昔单抗的患者获得抗性并不再从治疗中受益(63)。因此,还需IgG B11针对表达CD20的肿瘤的抗肿瘤活性的临床前研究,该研究将表明其对于治疗临床相关和不断增长的具有利妥昔单抗抗性或顽固的NHL患者的适用性。

[0017] 重要的是,本文显示了IgG B11具有广谱有效的体内抗骨髓瘤活性。尽管从早前B细胞阶段至B细胞接触抗原后的B细胞发育期间CD20广泛表达,分泌抗体的浆细胞和源自此阶段的癌,包括多发性骨髓瘤,一般不表达或显示出低的异源性CD20表达。因此,多发性骨髓瘤不太可能用类似利妥昔单抗的靶向CD20的疗法有效治疗(23)。

[0018] 相比之下,一些观察表明ICAM-1可为骨髓瘤治疗、特别是用类似IgGB11的抗体的靶向治疗的合适靶点;首先,最近的报道记载了原代多发性骨髓瘤浆细胞强表达ICAM-1,且在对化疗剂治疗响应的患者中,尤其是在对化疗产生抗性—当前多发性骨髓瘤必然发生的末期(64)的患者中(14,22),ICAM-1进一步上调。

[0019] 与这些观察一致的是,本文证明了,与患者的非骨髓瘤性淋巴细胞相比,绝大多数骨髓瘤细胞的B11靶向表位的表达水平增加。

[0020] 在恶性细胞上的高且同源性的靶点表达(当疾病进展时和当对当前可获得的治疗选择发生抗性时,所述靶点会上调)被认为是适于基于抗体的疗法的靶点的关键标志,特别是赋予针对癌细胞的直接细胞毒性的抗体。

[0021] 与作为IgG B11抗肿瘤活性重要机制的直接细胞毒性相一致,本发明证明了IgG B11抗肿瘤活性与表达ICAM-1受体的肿瘤细胞的IgG结合和饱和有关。而且,与作为直接肿瘤细胞毒性的主要作用模式相一致,除了其文献记载的诱导程序性细胞死亡的性质(10)外,IgG B11还在体内和体外都赋予了Fc:Fc $\gamma$ R依赖性的抗肿瘤活性。越来越多的证据表明,至少在不同的患者组中,抗体恒定结构域(Fc)与宿主Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)间的相互作用有助于利妥昔单抗和其他癌症抗体的临床活性(52,53,65-67)。

[0022] 因而,在独立的研究中,与携带至少一个较低亲和力Fc $\gamma$ R11a等位基因的患者相比,对所述抗体恒定Fc结构域具有最高亲和力的Fc $\gamma$ R11a等位基因纯和的NHL患者在对利用妥昔单抗的治疗的响应上显示出了改善的生存时间,而且利妥昔单抗的体内抗肿瘤活性关键取决于抗体Fc:宿主Fc $\gamma$ R相互作用(54)。

[0023] 尽管当前还没有通过批准的用于治疗多发性骨髓瘤的抗体,涉及Fc:Fc $\gamma$ R的治疗性抗体已经转变了治疗血癌和实体癌的道路(1)。临床前数据证明了当前所用的被开发用于骨髓瘤治疗的免疫调节药(ImiDs)增强了Fc:FcR依赖性抗肿瘤活性(Wu et al(2008) Clin Cancer Res,14pp4650-7)。免疫调节药是沙利多胺的结构和功能类似物,所述沙利多胺代表了用于治疗炎性、自身免疫和肿瘤疾病的有前景的一类新型免疫调节剂。

[0024] 这些观察表明可鉴定本发明提供的合适的骨髓瘤相关受体和靶向这些结构的参与Fc:Fc $\gamma$ R的抗体,此类靶点特异性抗体可改进骨髓瘤治疗和疾病预后(1)。因此,基于可获得的文献和本文所示的数据,这表明了ICAM-1:IgG B11可为骨髓瘤治疗提供一种具有吸引力的主方向(axis)。

[0025] 在另外的支持骨髓瘤治疗的靶向ICAM-1的干预中,ICA-1参与多发性骨髓瘤发病机理和在多个水平的抗药性的发生(12,14,22)。多发性骨髓瘤的特点是恶性浆细胞在骨髓中的浸润和扩散,且骨髓瘤细胞依赖与基质细胞的相互作用增殖和生存。ICAM-1通过结合其配体整合素 $\alpha$ L $\beta$ 2、整合素 $\alpha$ M $\beta$ 2和muc-1参与细胞粘附事件,启动了多种细胞信号通路,促进了多发性骨髓瘤细胞增殖、迁移、对PCD的抗性和细胞粘附分子诱导的抗药性发生的增加(12,68,69)。规划的研究旨在利用scid-hu体内实验模型(70)和骨髓瘤细胞与造骨细胞或破骨细胞体外共培养物(71)研究IgGB11对ICAM-1依赖性的人骨髓瘤-人基质细胞相互作用的影响。

[0026] 与利妥昔单抗和硼替佐米相比,从机制观点来看,IgG B11的改进的抗肿瘤活性更吸引人。与利妥昔单抗表位相比,改进的抗肿瘤活性并不来自肿瘤细胞表达的更多的ICAM-1表位,表明与利妥昔单抗相比IgG B11传递更强的死亡信号或者通过不同的信号转导或效应通路诱导细胞死亡。通过不同于利妥昔单抗和硼替佐米的通路启动细胞死亡的能力可在试图治疗已经获得对这些药的抗药性的肿瘤时特别重要。

[0027] 治疗性癌症抗体除了发挥重要的抗肿瘤活性外,还必须安全且患者可耐受。在正常的生理环境下,ICAM-1显示出了表达和组织分布受限,但在响应组织损伤或炎性压力的

几种细胞类型中上调,引发抗ICAM-1抗体治疗的安全性问题。然而,独立研究人员先前所做的研究证明了抗ICAM-1抗体能被不同的患者组良好耐受(75-79)。申请人的B11的临床前安全性评价表明它是安全的,且被良好耐受,而且没有B11增强或干扰重要的免疫细胞功能的证据。

[0028] 从药理学角度上看,由于其全人源性质,与先前开发的小鼠或嵌合ICAM-1抗体相比(80),预计B11是低免疫原性或非免疫原性的,并且具有人IgG典型的半衰期(2-3周)。因而,基于其显著的临床前抗骨髓瘤活性和预期的安全特性,多发性骨髓瘤中的IgG B11临床试验现在已经在美国着手开始。

[0029] 总之,本发明已鉴定了一种新型诱导细胞死亡的ICAM-1抗体(IgGB11),该抗体在多发性骨髓瘤临床前模型中具有比当前所用的包括硼替佐米(万科)、地塞米松、雷利米得和爱克兰(alkeran)在内的治疗更强的抗骨髓瘤活性。本发明还显示出用此类当前所用药剂体内治疗后收集的多数多发性骨髓瘤细胞维持或增加ICAM-1(包括B11表位)的表达,表明此类ICAM-1抗体特别有益于对先前其他试剂的治疗无响应或复发的患者。

[0030] 因此,在本发明的第一个方面中,本发明提供了:

[0031] 对ICAM-1具有结合特异性的抗体或其抗原结合片段、或者对ICAM-1具有结合特异性的所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或衍生物或者所述变体或衍生物的融合物在制备治疗患者癌症的药物中的用途,其中所述患者先前已经进行过所述癌症的治疗,但对所述治疗无响应或者对所述治疗先是有响应而之后复发。

[0032] 复发被定义为在早期实现的治疗性响应(即疾病状态的改善)后,具有症状性疾病的疾病进展。非响应性被定义为治疗期间的疾病进展或缺乏治疗性响应。

[0033] 有多种标准,临床医生可据此判断患者是否复发或者对具体疗法非响应。这些因素包括(但不限于):具有骨骼疼痛的新骨折,因低血红蛋白或肾功能障碍增加导致的疲劳,感染,血细胞计数,肿瘤大小或肿瘤再生长/回复,发生新癌(转移)。

[0034] 使用标准临床和实验室技术和仪器对任意这些因素进行实验室检测。

[0035] 在一种实施方式中,待治疗的癌症与所述患者先前治疗过的癌症相同。

[0036] 在另一实施方式中,待治疗的所述癌症与所述患者先前治疗过的癌症不同。

[0037] 在本发明的第二个方面中,本发明提供了:

[0038] 用于治疗患者癌症的对ICAM-1具有结合特异性的抗体或其抗原结合片段、或者对ICAM-1具有结合特异性的所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或衍生物、或者所述变体或衍生物的融合物,其中所述患者先前已经进行过所述癌症的治疗,但对所述治疗无响应或者对所述治疗先是有响应而之后复发。

[0039] 在一种实施方式中,待治疗的癌症与所述患者先前治疗过的癌症相同。

[0040] 在另一实施方式中,待治疗的癌症与所述患者先前治疗过的癌症不同。

[0041] 在本发明的第三个方面中,本发明提供了:

[0042] 一种治疗患者癌症的方法,所述患者先前已经进行过所述癌症的治疗,但对所述治疗无响应或者对所述治疗先是有响应而之后复发,所述方法包括将有效量的对ICAM-1具有结合特异性的抗体或其抗原结合片段、或者对ICAM-1具有结合特异性的所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或衍生物、或者所述变体或衍生物的融合物给药至所述患者的步骤。

[0043] 在一种实施方式中,待治疗的所述癌症是所述患者先前治疗过的癌症相同。

[0044] 在另一实施方式中,待治疗的所述癌症与所述患者先前治疗过的癌症不同。

[0045] 癌症治疗通过抑制肿瘤细胞增殖、抑制血管生成(对支持肿瘤生长必需的新血管的生长)和/或通过降低肿瘤细胞运动性或侵袭力抑制转移来促进肿瘤消退。

[0046] 本发明的抗体可在如下成人和儿童肿瘤中有效,包括:实体肿瘤/恶性肿瘤;局部晚期肿瘤;人软组织肉瘤;转移癌,包括淋巴转移癌;血细胞恶性肿瘤,包括多发性骨髓瘤、急性和慢性白血病、和淋巴瘤;头颈癌,包括口腔癌、喉癌和甲状腺癌;肺癌,包括小细胞癌和非小细胞癌;乳腺癌,包括小细胞癌和导管癌;胃肠癌,包括食管癌、胃癌、结肠癌、结直肠癌和与结直肠癌形成相关的息肉,胰腺癌、肝癌;泌尿道癌,包括膀胱癌和前列腺癌;女性生殖道恶性肿瘤,包括卵巢癌、子宫(包括子宫内膜)癌和卵巢囊泡中的实体瘤;肾癌,包括肾细胞癌;脑癌,包括内生性脑肿瘤、神经母细胞瘤、星形细胞脑肿瘤、神经胶质瘤、中枢神经系统中转移性肿瘤细胞侵袭;骨癌,包括骨瘤;皮肤癌,包括恶性黑素瘤,人皮肤角质形成细胞的肿瘤进展、鳞状细胞癌、基底细胞癌、血管外皮细胞瘤和卡波西肉瘤。

[0047] 治疗性组合物能单独以治疗有效剂量给药或联合诸如手术、化疗、放疗、热疗和激光疗法的辅助癌症疗法给药,并且可提供有益效果,例如减少肿瘤大小、降低肿瘤生长速度、抑制转移或改善总体临床症状,而不必根除所述癌症。

[0048] 另外,本发明的治疗性组合物可用于癌症的预防性治疗。本领域中已知使个体容易发生癌症的遗传条件和/或环境状况(例如接触致癌原)。在这些条件下,以有效治疗剂量的本发明抗体或抗原结合片段治疗这些个体可以有益于降低发生癌症的风险。

[0049] 体外模型能用于确定本发明抗体或其抗原结合片段作为潜在癌症治疗的有效剂量。这些体外模型包括对培养的肿瘤细胞进行的增殖试验、在软琼脂中培养的肿瘤细胞的生长(见Freshney,(1987)Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique, Wily-Liss, New York, NY, 第18章和第21章),Giovannella et al.,J.Natl.Can.Inst,52:921-30(1974)中描述的裸鼠中的肿瘤系统,Pilkington et al.,Anticancer Res.,17:4107-9(1997)中描述的Boyden Chamber试验中的肿瘤细胞的运动性和侵袭潜力,和诸如分别于Ribatta et al.,Intl.J.Dev.Biol.,40:1189-97(1999)和Li et al.,Clin.Exp.Metastasis,17:423-9(1999)中描述的鸡尿囊绒毛膜血管形成的诱导或血管内皮细胞迁移的诱导的血管生成试验。适当的肿瘤细胞系可获得自例如美国典型组织培养物保藏中心目录。

[0050] 在一种实施方式中,待治疗的癌症是血液肿瘤。

[0051] 血液肿瘤影响血液、骨髓和淋巴结。因为这三者在整个免疫系统中紧密相连,影响三者之一的疾病常常还影响其他两者,尽管技术上淋巴瘤是淋巴结的疾病,但它常扩散至骨髓,影响血液并偶尔产生副蛋白。

[0052] 血液恶性肿瘤可源自两种主要的血细胞系(髓样和淋巴样细胞系)之一。正常情况下,髓样细胞系产生粒细胞、红细胞、血小板、巨噬细胞和肥大细胞;淋巴样细胞系产生B、T、NK和浆细胞。淋巴瘤、淋巴细胞性白血病和骨髓瘤来自淋巴样细胞系,而急性和慢性骨髓性白血病、骨髓增生异常综合征和骨髓增生性疾病是源自髓样。

[0053] 在一种实施方式中,待治疗的所述癌症是淋巴增生性疾病(lymphoproliferative disorder,LPD)。



[0054] 淋巴增生性疾病(LPD)是指一些超量产生淋巴细胞的病症。它们一般发生在患有免疫系统受损的患者。

[0055] LPD的实例包括：

- [0056] • 滤泡性淋巴瘤
- [0057] • 慢性淋巴细胞性白血病
- [0058] • 急性淋巴母细胞性白血病
- [0059] • 毛细胞白血病
- [0060] • 淋巴瘤
- [0061] • 多发性骨髓瘤
- [0062] • 瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症
- [0063] • 维斯科特-奥尔德里奇综合征
- [0064] • 移植后淋巴增生性疾病
- [0065] • 自身免疫性淋巴增生综合征(ALPS)
- [0066] • 系统性红斑狼疮(SLE)

[0067] 在一种实施方式中,待治疗的所述癌症是淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤(NHL)。

[0068] 淋巴瘤是起始于免疫系统的淋巴细胞,并表现为淋巴样细胞实体肿瘤的癌症。这些恶性细胞常源自淋巴结,表现为淋巴结肿大(肿瘤)。淋巴瘤与同样源自淋巴细胞但一般仅涉及循环血液和骨髓(其中血细胞在称为造血作用的过程中生成)的淋巴样白血病密切相关,并且通常不形成静态肿瘤。有多种类型的淋巴瘤,淋巴瘤是称作血液肿瘤的一大组疾病的一部分。

[0069] 在一种实施方式中,待治疗的所述癌症是浆细胞疾病(也称为浆细胞恶液质)。

[0070] 癌症可表现为该病(浆细胞恶液质)的形式。浆细胞恶液质是由于可分泌或不分泌可检测水平的单克隆免疫球蛋白或通常称作M蛋白的副蛋白的浆细胞的单克隆群恶性增生而产生的。普通的浆细胞恶液质包括未定性单克隆免疫球蛋白病(MGUS)、多发性骨髓瘤、孤立性骨浆细胞瘤、髓外浆细胞瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(WM)、原发性淀粉样变性和重链病。

[0071] 在另一实施方式中,待治疗的所述癌症是多发性骨髓瘤。

[0072] 在一种实施方式中,所述治疗癌症的方法还包括另外的常规用于多发性骨髓瘤治疗的抗癌剂。

[0073] 提及“治疗”,本发明包括受试者/患者的治疗性和预防性治疗两者。术语“预防性”用于涵盖本发明所述防止或者减轻患者或受试者中的癌症(诸如多发性骨髓瘤)发生或发展的可能性的多肽或组合物的使用。

[0074] 本文使用的“治疗有效量”或“有效量”或“治疗上有效的”是指对给定的病症和给药方案提供治疗作用的量。其为经计算以与所需的添加剂和稀释剂(即载体或给药赋形剂)组合而产生期望的治疗作用的活性物质的预定量。此外,其还指足以降低或预防宿主的活动、功能和反应的临床显著性缺陷的量。或者,治疗有效量足以导致宿主中的临床显著病症的改进。在优选的实施方式中,本发明的第一个和第二个方面的用途和本发明的第三个方面的方法包括将约0.02mg/kg至20mg/kg之间剂量的抗体、抗原结合片段、或所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或衍生物给药至具有相应需要的患者的步骤。

[0075] 在特别优选的实施方式中,给药至患者的抗体、抗原结合片段、或所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或衍生物的剂量约在以下量之间:0.02mg/kg至0.10mg/kg;或0.10mg至0.20mg/kg;或0.20mg至0.30mg/kg;或0.30mg至0.40mg/kg;或0.40mg至0.50mg/kg;或0.50mg至0.60mg/kg;或0.60mg至0.70mg/kg;或0.70mg至0.80mg/kg;或0.80mg至0.90mg/kg;或0.90mg至1.00mg/kg;或1.00mg至1.10mg/kg;或1.10mg至1.20mg/kg;或1.20mg至1.30mg/kg;或1.30mg至1.40mg/kg;或1.40mg至1.50mg/kg;或1.50mg至1.60mg/kg;或1.60mg至1.70mg/kg;或1.70mg至1.80mg/kg;或1.80mg至1.90mg/kg;或1.90mg至2.00mg/kg;或2.00mg/g至2.10mg/kg;或2.10mg至2.20mg/kg;或2.20mg至2.30mg/kg;或2.30mg至2.40mg/kg;或2.40mg至2.50mg/kg;或2.50mg至2.60mg/kg;或2.60mg至2.70mg/kg;或2.70mg至2.80mg/kg;或2.80mg至2.90mg/kg;或2.90mg至3.00mg/kg;或3.00mg至3.10mg/kg;或3.10mg至3.20mg/kg;或3.20mg至3.30mg/kg;或3.30mg至3.40mg/kg;或3.40mg至3.50mg/kg;或3.50mg至3.60mg/kg;或3.60mg至3.70mg/kg;或3.70mg至3.80mg/kg;或3.80mg至3.90mg/kg;或3.90mg至4.00mg/kg;或4.00mg至4.10mg/kg;或4.10mg至4.20mg/kg;或4.20mg至4.30mg/kg;或4.30mg至4.40mg/kg;或4.40mg至4.50mg/kg;或4.50mg至4.60mg/kg;或4.60mg至4.70mg/kg;或4.70mg至4.80mg/kg;或4.80mg至4.90mg/kg;或4.90mg至5.00mg/kg;或5.00mg/kg至6.00mg/kg;或6.00mg至7.00mg/kg;或7.00mg至8.00mg/kg;或8.00mg至9.00mg/kg;或9.00mg至10.00mg/kg;或10.00mg至11.00mg/kg;或11.00mg至12.00mg/kg;或12.00mg至13.00mg/kg;或13.00mg至14.00mg/kg;或14.00mg至15.00mg/kg;或15.00mg至16.00mg/kg;或16.00mg至17.00mg/kg;或17.00mg至18.00mg/kg;或18.00mg至19.00mg/kg;或19.00mg至20.00mg/kg。

[0076] 在另一可选实施方式中,给药至患者的抗体、抗原结合片段、或所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或衍生物的剂量约为:0.02mg/kg,或0.03mg/kg,或0.04mg/kg,或0.05mg/kg,或0.06mg/kg,或0.07mg/kg,或0.08mg/kg,或0.09mg/kg,或0.10mg/kg,或0.15mg/kg,或0.20mg/kg,或0.25mg/kg,或0.30mg/kg,或0.35mg/kg,或0.40mg/kg,或0.45mg/kg,或0.50mg/kg,或0.60mg/kg,或0.70mg/kg,或0.80mg/kg,或0.90mg/kg,或1.00mg/kg,或1.10mg/kg,或1.20mg/kg,或1.30mg/kg,或1.40mg/kg,或1.50mg/kg,或1.60mg/kg,或1.70mg/kg,或1.80mg/kg,或1.90mg/kg,或2.00mg/kg,或2.10mg/kg,或2.20mg/kg,或2.30mg/kg,或2.40mg/kg,或2.50mg/kg,或2.60mg/kg,或2.70mg/kg,或2.80mg/kg,或2.90mg/kg,或3.00mg/kg,或3.10mg/kg,或3.20mg/kg,或3.30mg/kg,或3.40mg/kg,或3.50mg/kg,或3.60mg/kg,或3.70mg/kg,或3.80mg/kg,或3.90mg/kg,或4.00mg/kg,或4.10mg/kg,或4.20mg/kg,或4.30mg/kg,或4.40mg/kg,或4.50mg/kg,或4.60mg/kg,或4.70mg/kg,或4.80mg/kg,或4.90mg/kg,或5.00mg/kg,或6.00mg/kg,或7.00mg/kg,或8.00mg/kg,或9.00mg/kg,或10.00mg/kg,或11.00mg/kg,或12.00mg/kg,或13.00mg/kg,或14.00mg/kg,或15.00mg/kg,或16.00mg/kg,或17.00mg/kg,或18.00mg/kg,或19.00mg/kg,或20.00mg/kg。

[0077] 如本领域技术人员所知,抗体治疗能提供的治疗优势是能靶向癌细胞和保留周围组织的同时保持低毒性。利用诸如天然杀伤(NK)细胞介导的细胞死亡或直接诱导肿瘤细胞的凋亡而非坏死的生理机制,该耐受性可反映免疫球蛋白的动态作用。

[0078] 如本领域技术人员所知,抗体或其抗原结合片段的精确剂量可根据其具体的活性

而不同。适当的剂量可包含联合所需的稀释剂以产生所需治疗效果的计算所得的活性组合物的预定剂量。在关于本发明组合物的制备的方法和用途中,提供了有效治疗剂量的活性组分。如本领域公知,有效治疗剂量可由普通医学或兽医工作者基于患者的诸如年龄、体重、性别、症状、并发症、其他疾病等特征而确定。

[0079] 在另一实施方式中,本发明的用途、抗体或方法包括位于浆细胞表面的ICAM-1。

[0080] 在另一实施方式中,本发明的用途、抗体或方法包括能特异性地结合位于浆细胞表面的ICAM-1并诱导所述细胞程序性细胞死亡或凋亡的抗体或抗原结合片段或所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或衍生物。

[0081] 在另一实施方式中,本发明的用途、抗体或方法包括有效量约为0.1 $\mu$ g至5g的抗体、抗原结合片段、或所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或衍生物。

[0082] 在特别优选的实施方式中,所述抗体、抗原结合片段、所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或衍生物的有效量约为:0.10 $\mu$ g,或0.15 $\mu$ g,或0.20 $\mu$ g,或0.25 $\mu$ g,或0.30 $\mu$ g,或0.35 $\mu$ g,或0.4 $\mu$ g,或0.45 $\mu$ g,或0.50 $\mu$ g,或0.60 $\mu$ g,或0.70 $\mu$ g,或0.80 $\mu$ g,或0.90 $\mu$ g,或1.00 $\mu$ g,或1.10 $\mu$ g,或1.20 $\mu$ g,或1.30 $\mu$ g,或1.40 $\mu$ g,或1.50 $\mu$ g,或1.60 $\mu$ g,或1.70 $\mu$ g,或1.80 $\mu$ g,或1.90 $\mu$ g,或2.00 $\mu$ g,或2.10 $\mu$ g,或2.20 $\mu$ g,或2.30 $\mu$ g,或2.40 $\mu$ g,或2.50 $\mu$ g,或2.60 $\mu$ g,或2.70 $\mu$ g,或2.80 $\mu$ g,或2.90 $\mu$ g,或3.00 $\mu$ g,或3.10 $\mu$ g,或3.20 $\mu$ g,或3.30 $\mu$ g,或3.40 $\mu$ g,或3.50 $\mu$ g,或3.60 $\mu$ g,或3.70 $\mu$ g,或3.80 $\mu$ g,或3.90 $\mu$ g,或4.00 $\mu$ g,或4.10 $\mu$ g,或4.20 $\mu$ g,或4.30 $\mu$ g,或4.40 $\mu$ g,或4.50 $\mu$ g,或4.60 $\mu$ g,或4.70 $\mu$ g,或4.80 $\mu$ g,或4.90 $\mu$ g,或5.00 $\mu$ g,或6.00 $\mu$ g,或7.00 $\mu$ g,或8.00 $\mu$ g,或9.00 $\mu$ g,或10.00 $\mu$ g,或11.00 $\mu$ g,或12.00 $\mu$ g,或13.00 $\mu$ g,或14.00 $\mu$ g,或15.00 $\mu$ g,或16.00 $\mu$ g,或17.00g,或18.00 $\mu$ g,或19.00 $\mu$ g,或20.00 $\mu$ g,或21.00 $\mu$ g,或22.00 $\mu$ g,或23.00 $\mu$ g,或24.00 $\mu$ g,或25.00 $\mu$ g,或26.00 $\mu$ g,或27.00 $\mu$ g,或28.00 $\mu$ g,或29.00 $\mu$ g,或30.00 $\mu$ g,或31.00 $\mu$ g,或32.00 $\mu$ g,或33.00 $\mu$ g,或34.00 $\mu$ g,或35.00 $\mu$ g,或36.00 $\mu$ g,或37.00 $\mu$ g,或38.00 $\mu$ g,或39.00 $\mu$ g,或40.00 $\mu$ g,或41.00 $\mu$ g,或42.00 $\mu$ g,或43.00 $\mu$ g,或44.00 $\mu$ g,或45.00 $\mu$ g,或46.00 $\mu$ g,或47.00 $\mu$ g,或48.00 $\mu$ g,或49.00 $\mu$ g,或50.00 $\mu$ g,或51.00 $\mu$ g,或52.00 $\mu$ g,或53.00 $\mu$ g,或54.00 $\mu$ g,或55.00 $\mu$ g,或56.00 $\mu$ g,或57.00 $\mu$ g,或58.00 $\mu$ g,或59.00 $\mu$ g,或60.00 $\mu$ g,或61.00 $\mu$ g,或62.00pg,或63.00 $\mu$ g,或64.00 $\mu$ g,或65.00pg,或66.00 $\mu$ g,或67.00pg,或68.00 $\mu$ g,或69.00 $\mu$ g,或70.00 $\mu$ g,或71.00 $\mu$ g,或72.00 $\mu$ g,或73.00 $\mu$ g,或74.00 $\mu$ g,或75.00 $\mu$ g,或76.00 $\mu$ g,或77.00 $\mu$ g,或78.00 $\mu$ g,或79.00 $\mu$ g,或80.00 $\mu$ g,或81.00 $\mu$ g,或82.00 $\mu$ g,或83.00 $\mu$ g,或84.00 $\mu$ g,或85.00 $\mu$ g,或86.00 $\mu$ g,或87.00 $\mu$ g,或88.00 $\mu$ g,或89.00 $\mu$ g,或90.00 $\mu$ g,或91.00 $\mu$ g,或92.00 $\mu$ g,或93.00 $\mu$ g,或94.00 $\mu$ g,或95.00 $\mu$ g,或96.00 $\mu$ g,或97.00 $\mu$ g,或98.00 $\mu$ g,或99.00 $\mu$ g,或100.00 $\mu$ g(0.10mg),或0.15mg,或0.20mg,或0.25mg,或0.30mg,或0.35mg,或0.40mg,或0.45mg,或0.50mg,或0.60mg,或0.70mg,或0.80mg,或0.90mg,或1.00mg,或1.10mg,或1.20mg,或1.30mg,或1.40mg,或1.50mg,或1.60mg,或1.70mg,或1.80mg,或1.90mg,或2.00mg,或2.10mg,或2.20mg,或2.30mg,或2.40mg,或2.50mg,或2.60mg,或2.70mg,或2.80mg,或2.90mg,或3.00mg,或3.10mg,或3.20mg,或3.30mg,或3.40mg,或3.50mg,或3.60mg,或3.70mg,或3.80mg,或3.90mg,或4.00mg,或4.10mg,或4.20mg,或4.30mg,或4.40mg,或4.50mg,或4.60mg,或4.70mg,或4.80mg,或4.90mg,或5.00mg,或6.00mg,或7.00mg,或8.00mg,或9.00mg,或10.00mg,或11.00mg,或12.00mg,或13.00mg,或14.00mg,或15.00mg,或16.00mg,或17.00mg,或18.00mg,或19.00mg,或20.00mg,或

21.00mg,或22.00mg,或23.00mg,或24.00mg,或25.00mg,或26.00mg,或27.00mg,或28.00mg,或29.00mg,或30.00mg,或31.00mg,或32.00mg,或33.00mg,或34.00mg,或35.00mg,或36.00mg,或37.00mg,或38.00mg,或39.00mg,或40.00mg,或41.00mg,或42.00mg,或43.00mg,或44.00mg,或45.00mg,或46.00mg,或47.00mg,或48.00mg,或49.00mg,或50.00mg,或51.00mg,或52.00mg,或53.00mg,或54.00mg,或55.00mg,或56.00mg,或57.00mg,或58.00mg,或59.00mg,或60.00mg,或61.00mg,或62.00mg,或63.00mg,或64.00mg,或65.00mg,或66.00mg,或67.00mg,或68.00mg,或69.00mg,或70.00mg,或71.00mg,或72.00mg,或73.00mg,或74.00mg,或75.00mg,或76.00mg,或77.00mg,或78.00mg,或79.00mg,或80.00mg,或81.00mg,或82.00mg,或83.00mg,或84.00mg,或85.00mg,或86.00mg,或87.00mg,或88.00mg,或89.00mg,或90.00mg,或91.00mg,或92.00mg,或93.00mg,或94.00mg,或95.00mg,或96.00mg,或97.00mg,或98.00mg,或99.00mg,或100.00mg(0.10g),或0.15g,或0.20g,或0.25g,或0.30g,或0.35g,或0.40g,或0.45g,或0.50g,或0.60g,或0.70g,或0.80g,或0.90g,或1.00g,或1.10g,或1.20g,或1.30g,或1.40g,或1.50g,或1.60g,或1.70g,或1.80g,或1.90g,或2.00g,或2.10g,或2.20g,或2.30g,或2.40g,或2.50g,或2.60g,或2.70g,或2.80g,或2.90g,或3.00g,或3.10g,或3.20g,或3.30g,或3.40g,或3.50g,或3.60g,或3.70g,或3.80g,或3.90g,或4.00g,或4.10g,或4.20g,或4.30g,或4.40g,或4.50g,或4.60g,或4.70g,或4.80g,或4.90g,或5.00g。

[0083] 在特别优选的实施方式中,所述抗体、抗原结合片段、所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或衍生物的有效量约在以下量之间:0.10 $\mu$ g至0.20 $\mu$ g;或0.20 $\mu$ g至0.30 $\mu$ g;或0.30 $\mu$ g至0.40 $\mu$ g;或0.40 $\mu$ g至0.50 $\mu$ g;或0.50 $\mu$ g至0.60 $\mu$ g;或0.60 $\mu$ g至0.70 $\mu$ g;或0.70 $\mu$ g至0.80 $\mu$ g;或0.80 $\mu$ g至0.90 $\mu$ g;或0.90 $\mu$ g至1.00 $\mu$ g;或1.00 $\mu$ g至1.10 $\mu$ g;或1.10 $\mu$ g至1.20 $\mu$ g;或1.20 $\mu$ g至1.30 $\mu$ g;或1.30 $\mu$ g至1.40 $\mu$ g;或1.40 $\mu$ g至1.50 $\mu$ g;或1.50 $\mu$ g至1.60 $\mu$ g;或1.60 $\mu$ g至1.70 $\mu$ g;或1.70 $\mu$ g至1.80 $\mu$ g;或1.80 $\mu$ g至1.90 $\mu$ g;或1.90 $\mu$ g至2.00 $\mu$ g;或2.00 $\mu$ g至2.10 $\mu$ g;或2.10 $\mu$ g至2.20 $\mu$ g;或2.20 $\mu$ g至2.30 $\mu$ g;或2.30 $\mu$ g至2.40 $\mu$ g;或2.40 $\mu$ g至2.50 $\mu$ g;或2.50 $\mu$ g至2.60 $\mu$ g;或2.60 $\mu$ g至2.70 $\mu$ g;或2.70 $\mu$ g至2.80 $\mu$ g;或2.80 $\mu$ g至2.90 $\mu$ g;或2.90 $\mu$ g至3.00 $\mu$ g;或3.00 $\mu$ g至3.10 $\mu$ g;或3.10 $\mu$ g至3.20 $\mu$ g;或3.20 $\mu$ g至3.30 $\mu$ g;或3.30 $\mu$ g至3.40 $\mu$ g;或3.40 $\mu$ g至3.50 $\mu$ g;或3.50 $\mu$ g至3.60 $\mu$ g;或3.60 $\mu$ g至3.70 $\mu$ g;或3.70 $\mu$ g至3.80 $\mu$ g;或3.80 $\mu$ g至3.90 $\mu$ g;或3.90 $\mu$ g至4.00 $\mu$ g;或4.00 $\mu$ g至4.10 $\mu$ g;或4.10 $\mu$ g至4.20 $\mu$ g;或4.20 $\mu$ g至4.30 $\mu$ g;或4.30 $\mu$ g至4.40 $\mu$ g;或4.40 $\mu$ g至4.50 $\mu$ g;或4.50 $\mu$ g至4.60 $\mu$ g;或4.60 $\mu$ g至4.70 $\mu$ g;或4.70 $\mu$ g至4.80 $\mu$ g;或4.80 $\mu$ g至4.90 $\mu$ g;或4.90 $\mu$ g至5.00 $\mu$ g;或5.00 $\mu$ g至6.00 $\mu$ g;或6.00 $\mu$ g至7.00 $\mu$ g;或7.00 $\mu$ g至8.00 $\mu$ g;或8.00 $\mu$ g至9.00 $\mu$ g;或9.00 $\mu$ g至10.00 $\mu$ g;或10.00 $\mu$ g至11.00 $\mu$ g;或11.00 $\mu$ g至12.00 $\mu$ g;或12.00 $\mu$ g至13.00 $\mu$ g;或13.00 $\mu$ g至14.00 $\mu$ g;或14.00 $\mu$ g至15.00 $\mu$ g;或15.00 $\mu$ g至16.00 $\mu$ g;或16.00 $\mu$ g至17.00 $\mu$ g;或17.00 $\mu$ g至18.00 $\mu$ g;或18.00 $\mu$ g至19.00 $\mu$ g;或19.00 $\mu$ g至20.00 $\mu$ g;或20.00 $\mu$ g至21.00 $\mu$ g;或21.00 $\mu$ g至22.00 $\mu$ g;或22.00 $\mu$ g至23.00 $\mu$ g;或23.00 $\mu$ g至24.00 $\mu$ g;或24.00 $\mu$ g至25.00 $\mu$ g;或25.00 $\mu$ g至26.00 $\mu$ g;或26.00 $\mu$ g至27.00 $\mu$ g;或27.00 $\mu$ g至28.00 $\mu$ g;或28.00 $\mu$ g至29.00 $\mu$ g;或29.00 $\mu$ g至30.00 $\mu$ g;或30.00 $\mu$ g至31.00 $\mu$ g;或31.00 $\mu$ g至32.00 $\mu$ g;或32.00 $\mu$ g至33.00 $\mu$ g;或33.00 $\mu$ g至34.00 $\mu$ g;或34.00 $\mu$ g至35.00 $\mu$ g;或35.00 $\mu$ g至36.00 $\mu$ g;或36.00 $\mu$ g至37.00 $\mu$ g;或37.00 $\mu$ g至38.00 $\mu$ g;或38.00 $\mu$ g至39.00 $\mu$ g;或39.00 $\mu$ g至40.00 $\mu$ g。

g;或40.00 $\mu$ g至41.00 $\mu$ g;或41.00 $\mu$ g至42.00 $\mu$ g;或42.00 $\mu$ g至43.00 $\mu$ g;或43.00 $\mu$ g至44.00 $\mu$ g;或44.00 $\mu$ g至45.00 $\mu$ g;或45.00 $\mu$ g至46.00 $\mu$ g;或46.00 $\mu$ g至47.00 $\mu$ g;或47.00 $\mu$ g至48.00 $\mu$ g;或48.00 $\mu$ g至49.00 $\mu$ g;或49.00 $\mu$ g至50.00 $\mu$ g;或50.00 $\mu$ g至51.00 $\mu$ g;或51.00 $\mu$ g至52.00 $\mu$ g;或52.00 $\mu$ g至53.00 $\mu$ g;或53.00 $\mu$ g至54.00 $\mu$ g;或54.00 $\mu$ g至55.00 $\mu$ g;或55.00 $\mu$ g至56.00 $\mu$ g;或56.00 $\mu$ g至57.00 $\mu$ g;或57.00 $\mu$ g至58.00 $\mu$ g;或58.00 $\mu$ g至59.00 $\mu$ g;或59.00 $\mu$ g至60.00 $\mu$ g;或60.00 $\mu$ g至61.00 $\mu$ g;或61.00 $\mu$ g至62.00 $\mu$ g;或62.00 $\mu$ g至63.00 $\mu$ g;或63.00 $\mu$ g至64.00 $\mu$ g;或64.00 $\mu$ g至65.00 $\mu$ g;或65.00 $\mu$ g至66.00 $\mu$ g;或66.00 $\mu$ g至67.00 $\mu$ g;或67.00 $\mu$ g至68.00 $\mu$ g;或68.00 $\mu$ g至69.00 $\mu$ g;或69.00 $\mu$ g至70.00 $\mu$ g;或70.00 $\mu$ g至71.00 $\mu$ g;或71.00 $\mu$ g至72.00 $\mu$ g;或72.00 $\mu$ g至73.00 $\mu$ g;或73.00 $\mu$ g至74.00 $\mu$ g;或74.00 $\mu$ g至75.00 $\mu$ g;或75.00 $\mu$ g至76.00 $\mu$ g;或76.00 $\mu$ g至77.00 $\mu$ g;或77.00 $\mu$ g至78.00 $\mu$ g;或78.00 $\mu$ g至79.00 $\mu$ g;或79.00 $\mu$ g至80.00 $\mu$ g;或80.00 $\mu$ g至81.00 $\mu$ g;或81.00 $\mu$ g至82.00 $\mu$ g;或82.00 $\mu$ g至83.00 $\mu$ g;或83.00 $\mu$ g至84.00 $\mu$ g;或84.00 $\mu$ g至85.00 $\mu$ g;或85.00 $\mu$ g至86.00 $\mu$ g;或86.00 $\mu$ g至87.00 $\mu$ g;或87.00 $\mu$ g至88.00 $\mu$ g;或88.00 $\mu$ g至89.00 $\mu$ g;或89.00 $\mu$ g至90.00 $\mu$ g;或90.00 $\mu$ g至91.00 $\mu$ g;或91.00 $\mu$ g至92.00 $\mu$ g;或92.00 $\mu$ g至93.00 $\mu$ g;或93.00 $\mu$ g至94.00 $\mu$ g;或94.00 $\mu$ g至95.00 $\mu$ g;或95.00 $\mu$ g至96.00 $\mu$ g;或96.00 $\mu$ g至97.00 $\mu$ g;或97.00 $\mu$ g至98.00 $\mu$ g;或98.00 $\mu$ g至99.00 $\mu$ g;或99.00 $\mu$ g至100.00 $\mu$ g;或100.00 $\mu$ g(0.10mg)至0.20mg;或0.20mg至0.30mg;或0.30mg至0.40mg;或0.40mg至0.50mg;或0.50mg至0.60mg;或0.60mg至0.70mg;或0.70mg至0.80mg;或0.80mg至0.90mg;或0.90mg至1.00mg;或1.00mg至1.10mg;或1.10mg至1.20mg;或1.20mg至1.30mg;或1.30mg至1.40mg;或1.40mg至1.50mg;或1.50mg至1.60mg;或1.60mg至1.70mg;或1.70mg至1.80mg;或1.80mg至1.90mg;或1.90mg至2.00mg;或2.00mg至2.10mg;或2.10mg至2.20mg;或2.20mg至2.30mg;或2.30mg至2.40mg;或2.40mg至2.50mg;或2.50mg至2.60mg;或2.60mg至2.70mg;或2.70mg至2.80mg;或2.80mg至2.90mg;或2.90mg至3.00mg;或3.00mg至3.10mg;或3.10mg至3.20mg;或3.20mg至3.30mg;或3.30mg至3.40mg;或3.40mg至3.50mg;或3.50mg至3.60mg;或3.60mg至3.70mg;或3.70mg至3.80mg;或3.80mg至3.90mg;或3.90mg至4.00mg;或4.00mg至4.10mg;或4.10mg至4.20mg;或4.20mg至4.30mg;或4.30mg至4.40mg;或4.40mg至4.50mg;或4.50mg至4.60mg;或4.60mg至4.70mg;或4.70mg至4.80mg;或4.80mg至4.90mg;或4.90mg至5.00mg;或5.00mg至6.00mg;或6.00mg至7.00mg;或7.00mg至8.00mg;或8.00mg至9.00mg;或9.00mg至10.00mg;或10.00mg至11.00mg;或11.00mg至12.00mg;或12.00mg至13.00mg;或13.00mg至14.00mg;或14.00mg至15.00mg;或15.00mg至16.00mg;或16.00mg至17.00mg;或17.00mg至18.00mg;或18.00mg至19.00mg;或19.00mg至20.00mg;或20.00mg至21.00mg;或21.00mg至22.00mg;或22.00mg至23.00mg;或23.00mg至24.00mg;或24.00mg至25.00mg;或25.00mg至26.00mg;或26.00mg至27.00mg;或27.00mg至28.00mg;或28.00mg至29.00mg;或29.00mg至30.00mg;或30.00mg至31.00mg;或31.00mg至32.00mg;或32.00mg至33.00mg;或33.00mg至34.00mg;或34.00mg至35.00mg;或35.00mg至36.00mg;或36.00mg至37.00mg;或37.00mg至38.00mg;或38.00mg至39.00mg;或39.00mg至40.00mg;或40.00mg至41.00mg;或41.00mg至42.00mg;或42.00mg至43.00mg;或43.00mg至44.00mg;或44.00mg至45.00mg;或45.00mg至46.00mg;或46.00mg至47.00mg;或47.00mg至48.00mg;或48.00mg至49.00mg;或49.00mg至50.00mg;或50.00mg至51.00mg;或51.00mg至52.00mg;或52.00mg至53.00mg;或53.00mg至54.00mg;或54.00mg至55.00mg;或55.00mg至56.00mg;或56.00mg至57.00mg;或

57.00mg至58.00mg;或58.00mg至59.00mg;或59.00mg至60.00mg;或60.00mg至61.00mg;或61.00mg至62.00mg;或62.00mg至63.00mg;或63.00mg至64.00mg;或64.00mg至65.00mg;或65.00mg至66.00mg;或66.00mg至67.00mg;或67.00mg至68.00mg;或68.00mg至69.00mg;或69.00mg至70.00mg;或70.00mg至71.00mg;或71.00mg至72.00mg;或72.00mg至73.00mg;或73.00mg至74.00mg;或74.00mg至75.00mg;或75.00mg至76.00mg;或76.00mg至77.00mg;或77.00mg至78.00mg;或78.00mg至79.00mg;或79.00mg至80.00mg;或80.00mg至81.00mg;或81.00mg至82.00mg;或82.00mg至83.00mg;或83.00mg至84.00mg;或84.00mg至85.00mg;或85.00mg至86.00mg;或86.00mg至87.00mg;或87.00mg至88.00mg;或88.00mg至89.00mg;或89.00mg至90.00mg;或90.00mg至91.00mg;或91.00mg至92.00mg;或92.00mg至93.00mg;或93.00mg至94.00mg;或94.00mg至95.00mg;或95.00mg至96.00mg;或96.00mg至97.00mg;或97.00mg至98.00mg;或98.00mg至99.00mg;或99.00mg至100.00mg;或100.00mg(0.10g)至0.20g;或0.20g至0.30g;或0.30g至0.40g;或0.40g至0.50g;或0.50g至0.60g;或0.60g至0.70g;或0.70g至0.80g;或0.80g至0.90g;或0.90g至1.00g;或1.00g至1.10g;或1.10g至1.20g;或1.20g至1.30g;或1.30g至1.40g;或1.40g至1.50g;或1.50g至1.60g;或1.60g至1.70g;或1.70g至1.80g;或1.80g至1.90g;或1.90g至2.00g;或2.00g至2.10g;或2.10g至2.20g;或2.20g至2.30g;或2.30g至2.40g;或2.40g至2.50g;或2.50g至2.60g;或2.60g至2.70g;或2.70g至2.80g;或2.80g至2.90g;或2.90g至3.00g;或3.00g至3.10g;或3.10g至3.20g;或3.20g至3.30g;或3.30g至3.40g;或3.40g至3.50g;或3.50g至3.60g;或3.60g至3.70g;或3.70g至3.80g;或3.80g至3.90g;或3.90g至4.00g;或4.00g至4.10g;或4.10g至4.20g;或4.20g至4.30g;或4.30g至4.40g;或4.40g至4.50g;或4.50g至4.60g;或4.60g至4.70g;或4.70g至4.80g;或4.80g至4.90g;或4.90g至5.00g。

[0084] 在另一实施方式中,本发明的用途、抗体或方法的抗体或抗原结合片段、或所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或衍生物包括完整抗体或由完整抗体组成。

[0085] “抗体”包括基本完整的抗体分子,以及嵌合抗体、人源化抗体、人抗体(其中相对于天然存在的人抗体至少一个氨基酸发生突变)、单链抗体、双特异性抗体、抗体重链、抗体轻链、抗体重链和/或轻链的同源二聚体和异源二聚体,及其抗原结合片段和衍生物。

[0086] 术语“抗体”还包括所有类别的抗体,包括IgG、IgA、IgM、IgD和IgE。因而,所述抗体可以是IgG分子,诸如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4分子。优选地,本发明的抗体是IgG分子或抗原结合片段,或IgG分子或抗原结合片段的变体、融合物或衍生物。

[0087] 在本发明用途、抗体或方法的一种实施方式中,所述抗体包括完整抗体或由完整抗体组成。可选地,所述抗体或抗原结合片段,或所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或衍生物,可基本上由完整抗体组成。“基本上由……组成”是指所述抗体或抗原结合片段,或所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或衍生物由足以显示对ICAM-1结合特异性的完整抗体的一部分组成。

[0088] 在本发明用途、抗体或方法的一种实施方式中,所述抗体是非天然存在的抗体。当然,当所述抗体是天然存在的抗体时,以分离的形式(即不同于其天然存在的形式)提供。

[0089] 抗体的重链可变区( $V_H$ )和轻链可变区( $V_L$ )参与抗原识别,这是首先通过早期蛋白酶消化实验而认识到的事实。通过啮齿类抗体的“人源化”发现了进一步的证据。源于啮齿类的可变区可与源于人的恒定区融合,从而使所得的抗体保留啮齿源抗体的抗原特异性

(Morrison et al(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA81,6851-6855)。

[0090] 根据涉及均包含一种或多种可变区的抗体片段的细菌表达的实验,已知抗原特异性由可变区赋予,并且与恒定区无关。这些分子包括Fab样分子(Better et al(1988)Science240,1041);Fv分子(Skerra et al(1988)Science 240,1038);通过柔性寡肽连接V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>配偶区的单链Fv(ScFv)分子(Bird et al(1988)Science242,423;Huston et al(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA85,5879)和包含分离的V区的单域抗体(dAb)(Ward et al(1989)Nature341,544)。涉及合成保留其特异结合位点的抗体片段的技术的综述可见于Winter & Milstein(1991)Nature349,293-299。

[0091] 因而,“抗原结合片段”是指能结合ICAM-1的抗体功能性片段。

[0092] 示例性的抗原结合片段可选至Fv片段(例如单链Fv和具有二硫键的Fv)和Fab样片段(例如Fab片段、Fab'片段和F(ab)<sub>2</sub>片段)组成的组。

[0093] 在本发明用途、抗体或方法的一种实施方式中,抗原结合片段是单链Fv(scFv)或具有二硫键的Fv。

[0094] 方便地,抗原结合片段是Fab'片段或F(ab)<sub>2</sub>。

[0095] 使用抗体片段而非完整抗体具有数倍的优势。所述片段较小的尺寸可产生改进的药理学性质,例如更好的实体组织穿透性。此外,抗原结合片段,例如Fab、Fv、ScFv和dAb抗体片段能够在大肠杆菌(E.coli)中表达并分泌,由此可容易地生产大量的所述片段。

[0096] 本发明的范围还包括抗体及其抗原结合片段的修饰形式,例如通过共价连接聚乙二醇或其他合适聚合物的修饰。

[0097] 用于产生抗体和抗体片段的方法是本领域熟知的。例如,抗体的产生可通过采用诱导抗体分子的体内产生、筛选免疫球蛋白库的多种方法中的任一种(Orlandi et al, 1989.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.86:3833-3837;Winter et al.,1991,Nature349:293-299),或通过培养的细胞系产生单克隆抗体分子。这些包括但不限于杂交瘤技术,人B细胞杂交瘤技术和EB病毒(EBV)-杂交瘤技术(Kohler et al.,1975.Nature256:4950497;Kozbor et al.,1985.J.Immunol.Methods81:31-42;Cote et al.,1983.Proc.Natl.Acad.Sci.USA80:2026-2030;Cole et al.,1984.Mol.Cell.Biol.62:109-120)。

[0098] 方便地,本发明提供抗体或抗原结合片段,或所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或衍生物,其中所述抗体是重组抗体(即其中所述抗体由重组方式产生)。

[0099] 在本发明的用途、抗体或方法的优选实施方式中,所述抗体是单克隆抗体。

[0100] 可通过已知的技术制备针对所选抗原的适合的单克隆抗体,例如在“Monoclonal Antibodies:A manual of techniques”,H Zola(CRC Press,1988)和“Monoclonal Hybridoma Antibodies:Techniques and Applications”,J G RHurrell(CRC Press,1982)中公开的那些,以上文献通过引用并入本文。

[0101] 抗体片段还可通过使用本领域熟知的方法获得(参见,例如Harlow & Lane,1988,“Antibodies:A Laboratory Manual”,Cold Spring HarborLaboratory,New York,该文献通过引用并入本文)。例如,用于本发明方法和用途的抗体片段可通过抗体的蛋白水解或通过在大肠杆菌或哺乳动物细胞(例如,中国仓鼠卵巢细胞培养物或其他蛋白表达系统)中表达编码所述片段的DNA来制备。或者,可通过常规方法由完整抗体的胃蛋白酶或木瓜蛋白酶

降解获得抗体片段。

[0102] 优选地,本发明提供了用途、方法、组合物或系统,其中所述抗体或其抗原结合片段是人抗体或人源化抗体。

[0103] 本领域技术人员可以理解,人源化抗体可用于人的治疗或诊断。人源化形式的非人(例如鼠)抗体是基因工程化的嵌合抗体或具有源自非人抗体的极小部分的抗体片段。人源化抗体包括这样的抗体:即,其中人抗体(受者抗体)的互补决定区被来自具有期望功能性的非人物种,例如小鼠、大鼠或兔(供体抗体)的互补决定区的残基取代的抗体。在一些情况下,人抗体的Fv框架残基被相应的非人残基取代。人源化抗体还可包含既没有见于受者抗体中,也没有见于引入的互补决定区(CDR)或框架序列中的残基。通常,人源化抗体可包含基本全部的至少一个且通常两个可变域,其中全部或基本全部的互补决定区对应于非人抗体的那些,且全部或基本全部的框架区对应于相关的人共有序列的那些。最佳地,人源化抗体还包括至少一部分的抗体恒定区,例如Fc区,其通常源自人抗体(参见,例如Jones et al.,1986.Nature321:522-525;Riechmann et al.,1988,Nature332:323-329;Presta,1992,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596,该两篇文献通过引用并入本文)。

[0104] 用于将非人抗体人源化的方法是本领域熟知的。通常,所述人源化抗体具有引入其中的来自非人来源的一个或多个氨基酸残基。这些常被称作引入残基的非人氨基酸残基通常来自引入的可变域。人源化可基本按照文献描述(参见,例如Jones et al.,1986,Nature321:522-525;Reichmann et al.,1988.Nature332:323-327;Verhoeyen et al.,1988,Science239:1534-1536;US4,816,567,这些文献通过引用并入本文),通过使用对应的啮齿类互补决定区取代人的互补决定区而进行。因此,此类人源化抗体为嵌合抗体,其中,基本小于完整的人可变域的序列已经被来自非人物种的对应序列取代。实际上,人源化抗体通常可以是其中一些互补决定区残基、且可能地一些框架残基被来自啮齿类抗体中类似位点的残基取代的人抗体。

[0105] 也可以使用本领域中已知的多种技术鉴定人抗体,包括噬菌体展示文库(参见,例如Hoogenboom & Winter,1991,J.Mol.Biol.227:381;Marks et al.,1991,J.Mol.Biol.222:581;Cole et al.,1985,Monoclonal antibodies and Cancer Therapy, Alan R.Liss,第77页;Boerner et al.,1991.J.Immunol.147:86-95;Soderlind et al.,2000,Nat Biotechnol18:852-6和W098/32845,这些文献通过引用并入本文)。

[0106] 一旦获得适合的抗体,可检测其活性,例如所述抗体的结合特异性或生物活性,例如,通过ELISA、免疫组织化学法、流式细胞术、免疫沉淀法、Western印迹等。所述生物活性可在读出该具体特征的不同试验中检测。

[0107] 方便地,本发明的抗体或其抗原结合片段包括一个或多个以下的氨基酸序列(CDR区):

[0108] FSNAWMSWVRQAPG和/或

[0109] AFIWYDGSNKYYADSVKGR和/或

[0110] ARYSGWYFDY和/或

[0111] CTGSSSNIGAGYDVH和/或

[0112] DNNNRPS和/或

[0113] CQSYDSSLAWL。



[0114] 可选地,本发明的抗体或其抗原结合片段包括一个或多个图15中显示的可变区。

[0115] 本文使用的术语“氨基酸”包括20种遗传编码的氨基酸及其相应的'D'型(与天然的'L'型相比)立体异构体, $\omega$ -氨基酸,其他非天然存在的氨基酸,非常规氨基酸(例如, $\alpha$ , $\alpha$ -双取代的氨基酸,N-烷基氨基酸等)和化学衍生化的氨基酸(见下文)。

[0116] 除非另有明确指明,氨基酸在专门列出时,例如“丙氨酸”或“Ala”或“A”,此术语是指L-丙氨酸和D-丙氨酸二者。其他非常规氨基酸也可以是本发明多肽的合适组分,只要所述多肽保留了所需的功能性质。对于本文显示的多肽,在适合的情况下,每个编码的氨基酸残基由对应于常规氨基酸的俗名的单个字母名称表示。

[0117] 在一种实施方式中,本文定义的多肽包括L氨基酸或由L氨基酸组成。

[0118] 本领域技术人员知道,本发明的方法和用途包含所定义的多肽的变体、融合物和衍生物,以及所述变体或衍生物的融合物,只要此类变体、融合物以及衍生物对ICAM-1具有结合特异性。

[0119] 变体可以用本领域熟知的使用重组多核苷酸的蛋白工程化和定点诱变的方法制得(例如,参见Molecular Cloning:a Laboratory Manual,第3版,Sambrook & Russell, 2000,Cold Spring Harbor Laboratory Press,该文献通过引用并入本文)。

[0120] 所述多肽的“融合物”包括与任何其他多肽融合的多肽。例如,所述多肽可以与诸如谷胱甘肽-S-转移酶(GST)或蛋白A的多肽融合,以有利于该多肽的纯化。此类融合物的实例是本领域技术人员公知的。类似地,所述多肽可以与诸如His6的寡聚组氨酸标签或诸如公知的Myc标签表位的由抗体识别的表位融合。所述多肽的任意变体或衍生物的融合物也包括在本发明范围内。应知道,优选保留所需性质的融合物(或其变体或衍生物),所述性质例如对ICAM-1具有结合特异性。

[0121] 所述融合物可包含赋予本发明所述多肽所需特征的其他部分,例如所述部分可用于检测或分离所述多肽,或促进所述多肽的细胞摄取。如本领域技术人员所公知,所述部分可以是,例如生物素部分、放射性部分、荧光部分,例如小荧光团或绿色荧光蛋白(GFP)荧光团。所述部分可以是免疫原性标签,例如,本领域技术人员已知的Myc标签,或者可以是本领域技术人员已知的能够促进所述多肽细胞摄取的亲脂性分子或多肽域。

[0122] 所述多肽的“变体”包括保守或非保守性的插入、删除和取代。特别地,其包括所述多肽的变体,其中此类改变基本不改变所述多肽的活性。特别地,其包括所述多肽的变体,其中此类改变基本不改变对ICAM-1的结合特异性。

[0123] 多肽变体可具有与一个或多个以上给定的氨基酸序列具有至少75%同一性的氨基酸序列,例如,与一个或多个以上特定的氨基酸序列具有至少80%,至少90%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%或至少99%同一性。

[0124] 可使用适合的计算机程序确定两条多肽之间的序列同一性百分比,例如University of Wisconsin Genetic Computing Group的GAP程序,并且应理解,所述同一性百分比是相对于其序列经最佳比对的多肽而计算的。

[0125] 或者,也可以使用Clustal W程序(如Thompson et al.,1994,Nucl.Acid Res.22: 4673-4680中所述,该文献通过引用并入本文)进行比对。

[0126] 所用的参数可如下:

[0127] -快速成对比对参数:K元组(字)大小,1;窗口大小,5;空位罚分,3;上对角线(top

diagonals)的数量,5;计分方法,x百分比。

[0128] -多比对参数:空位开放罚分,10;空位延伸罚分,0.05。

[0129] -计分矩阵:BLOSUM。

[0130] 或者,可使用BESTFIT程序测定局部序列的比对。

[0131] 本发明方法或用途中所用的多肽、变体、融合物或衍生物可包括一个或多个已经修饰过或衍生的氨基酸。

[0132] 可通过与官能侧基的反应实现一个或多个氨基酸的化学衍生。此类衍生化的分子包括,例如其中的游离氨基经衍生形成胺的盐酸盐,p-甲苯磺酰基、羧基苯酰氧基、叔丁氧基羰基、氯乙酰基或甲酰基。游离羧基可经衍生形成盐,甲基酯和乙基酯或其他类型的酯和腈类。游离羟基可经衍生形成O-酰基或O-烷基衍生物。化学衍生物还包括包含20种标准氨基酸的天然存在氨基酸衍生物的那些肽。例如:可由4-羟基脯氨酸取代脯氨酸;由5-羟基赖氨酸取代赖氨酸;由3-甲基组氨酸取代组氨酸;由高丝氨酸取代丝氨酸,以及由鸟氨酸取代赖氨酸。衍生物还包括包含一个或多个添加或删除的肽,只要必需的活性得到保留。所包括的其他修饰为酰胺化、氨基末端酰化(例如,乙酰化或巯基乙酸酰胺化)、末端羧基酰胺化(例如,使用氨或甲胺),以及类似的末端修饰。

[0133] 本领域技术人员还可以理解拟肽化合物也是有用的。因此,“多肽”包括能够结合ICAM-1的拟肽化合物。术语“拟肽”是指模拟作为治疗剂的具体肽的构象和期望特征的化合物。

[0134] 例如,本发明的多肽不仅包含其中的氨基酸残基通过肽键(-CO-NH-)连接的分子,还包括其中的肽键被反转(reversed)的分子。此类反转型(retro-inverso)拟肽可使用本领域已知的方法制备,例如Meziere et al.(1997)J.Immunol.159,3230-3237中描述的那些,该文献通过引用并入本文。此方法包括制备包含涉及骨架变化但侧链定位不变的拟肽。包含替代CO-NH肽键的NH-CO键的反转肽对蛋白水解的抗性高很多。或者,本发明的多肽可以是拟肽化合物,其中一个或多个氨基酸残基通过-y(CH<sub>2</sub>NH)-键而不是常规酰胺键连接。

[0135] 或者,可无需所述肽键,只要使用保留了氨基酸残基的碳原子之间的间隙的适合的连接子部分;连接子部分具有与肽键基本相同的电荷分布和基本相同极性是有利的。

[0136] 应理解,可方便地封闭所述多肽的N末端或C末端,从而有助于降低对外切蛋白酶降解的易感性。

[0137] 现已使用多种非编码的或修饰的氨基酸,例如D-氨基酸和N-甲基氨基酸,来修饰哺乳动物肽。此外,可通过共价修饰来稳定推测的生物活性构象,例如环化,或通过引入内酰胺或其他类型的桥键,例如参见Veber et al.,1978,Proc.Natl.Acad.Sci.USA75:2636和Thursell et al.,1983,Biochem.Biophys.Res.Comm.111:166,该两篇文献通过引用并入本文。

[0138] 很多合成策略中的常见主题是向基于肽的骨架中引入一些环状部分。所述环状部分限制肽结构的构象空间,这常常导致肽对特定生物受体的特异性提高。这种策略的额外优点是将环状部分引入到肽中还可产生对细胞肽酶的敏感性降低的肽。

[0139] 因而,本发明方法和用途中的有用的示例性多肽可包含末端的半胱氨酸。此类多肽可通过末端半胱氨酸的巯基形成的二硫键以杂环形式(heterodetic cyclic form)存在,或通过末端氨基酸之间形成酰胺肽键以均环形式(homodetic form)存在。如上所述,通

过N末端和C末端半胱氨酸之间的二硫键或酰胺键使小肽环化可以通过减少蛋白水解且还提高结构刚性以产生特异性更高的化合物,而克服了有时见于线性肽中特异性和半衰期的问题。通过二硫键环化的多肽具有游离的氨基和羧基末端,其仍可能对蛋白降解敏感,而通过在N-末端氨基和C-末端羧基之间形成酰胺键环化的肽由此不再包含游离的氨基或羧基末端。因此,本发明所述的肽可通过C-N键或二硫键连接。

[0140] 本发明不以任何方式受限于用于对肽进行环化的方法,而是包括其环状结构可通过任何适合的合成方法获得的肽。因此,杂键(heterodetic linkage)可包括但不限于通过二硫键桥、亚烷基桥或硫键桥形成的杂键。合成包含二硫键桥、硫键桥和亚烷基桥的均环肽和杂环肽的方法公开在US5,643,872,该文献通过引用并入本文。US6,008,058中讨论并公开了环化方法的其他实例,该文献通过引用并入本文。

[0141] 用于合成环状的稳定拟肽化合物的其他方法是闭环复分解反应(RCM)。此方法包括合成肽前体和使其与RCM催化剂接触以产生构象限制性肽的步骤。适合的肽前体可包含两个或更多的不饱和和C-C键。此方法可使用固相肽合成技术进行。在此实施方式中,使锚定在固体支持物上的前体接触RCM催化剂,随后从所述固体支持物切出产物以获得构象限制性肽。

[0142] 由D.H.Rich在Protease Inhibitors,Barrett and Selveson编辑,Elsevier (1986)(通过引用并入本文)中公开的另一种方法通过将过渡态类似物的概念应用于酶抑制剂设计而设计出了肽模拟物。例如,已知staline的仲醇模拟了胃蛋白酶底物的易切割酰胺键的四面体过渡态。

[0143] 总之,已知末端修饰有助于降低对蛋白酶降解的易感性,并由此延长肽在溶液中的半衰期,特别是在其中具有蛋白酶的生物流体中的半衰期。因为通过环化形成的稳定结构,以及对于见于环状肽的生物活性的考虑,多肽环化也是有用的修饰。

[0144] 因而,在一种实施方式中,本发明用途、方法、组合物和系统中所用的多肽是环状的。然而,在一种可选实施方式中,多肽是线性的。

[0145] 在本发明用途、抗体或方法的优选实施方式中,抗体或抗原结合片段,或所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或衍生物能特异性地结合位于细胞表面的ICAM-1,并抑制和/或阻止该细胞的增生。

[0146] 在一种可选实施方式中,抗体或抗原结合片段,或所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或衍生物能特异性地结合位于细胞表面的ICAM-1,并诱导该细胞的凋亡。

[0147] 在一种可选实施方式中,抗体或抗原结合片段,或所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或衍生物能特异性地结合位于细胞表面的ICAM-1,并诱导抗该细胞的抗体依赖性细胞毒性。

[0148] 可使用可注射的缓释给药系统递送本发明的抗体、抗原结合片段,和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体,以及药物,可以用可注射的持续释放的药物递送系统递送。这些经过专门设计以降低注射的频率。此类系统的实例是Nutropin Depot,其将重组人生长激素(rhGH)包封在可生物降解的微球中,其一经注射,即在较长的时期中缓慢地释放rhGH。优选地,通过肌肉内(i.m.)和/或皮下(s.c.)和/或静脉内(i.v.)进行递送。

[0149] 可通过将药物直接释放到所需位点的手术植入装置施用本发明的抗体、抗原结合片段,和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体,和药物。例如,Vitrasert将

更昔洛韦直接释放到眼中以治疗巨细胞病毒(CMV)视网膜炎。将此毒性剂直接应用到患病位点实现了有效的治疗,而没有药物的显著的全身副作用。

[0150] 也可应用电穿孔治疗(EPT)系统来施用本发明的抗体、抗原结合片段,和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体,药物和药物组合物。向细胞施加脉冲电场的装置提高了所述细胞膜对药物的可透性,导致细胞内药物递送显著增强。

[0151] 还可通过电引入(electro-incorporation,EI)递送本发明的抗体、抗原结合片段,和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体,以及药物。EI发生在皮肤表面上直径达30微米的小颗粒受到与用于电穿孔相同或类似的电脉冲的情况下。在EI中,这些颗粒被驱动穿过角质层,并进入皮肤的较深层。所述颗粒可负载或包被药物或基因,或能够仅充当在皮肤中产生使药物能够由此进入的孔的“子弹”。

[0152] 用于递送本发明的抗体、抗原结合片段,和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体,以及药物的可选方法是热敏的ReGel®注射系统。低于体温时,ReGel是可注射的液体,而在体温下,其立即形成缓慢消蚀并溶解成已知安全的可生物降解聚合物的凝胶库。活性物质随着生物聚合物的溶解而随时间递送。

[0153] 本发明的抗体、抗原结合片段、和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体以及药物也能口服递送。此方法利用了口服摄取维生素B<sub>12</sub>和/或维生素D以在体内共递送蛋白和肽的天然过程。借助维生素B<sub>12</sub>和/或维生素D摄取系统,本发明的抗体、抗原结合片段、和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体以及药物能够移动通过肠壁。在维生素B<sub>12</sub>类似物和/或维生素D类似物与药物之间合成复合物,所述药物既保留了复合物的维生素B<sub>12</sub>部分和/或维生素D部分中对内因素(IF)的显著亲和力,还保留了所述复合物的活性物质的显著生物活性。

[0154] 本发明的抗体、抗原结合片段、和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体以及药物可通过“特洛伊肽(Trojan peptide)”引入到细胞。这是被称作“穿透素(penetratin)”的一类多肽,其具有转位性质,并且能够携带亲水化合物跨过质膜。此系统可以引导寡肽靶向细胞质和细胞核,并且具有非细胞类型特异性和高效性。参见Derossi et al.(1998),Trends Cell Biol8,84-87。

[0155] 优选地,本发明的药物是含有日剂量或单位、日亚剂量或其适合的小部分的活性组分的单位剂型。

[0156] 本发明的抗体、抗原结合片段、和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体以及药物通常通过口服或任何胃肠外途径施用,其可以是药学可接受的剂型的包含活性组分的药物组合物的形式,其中任选地,所述活性组分是无毒的有机酸或无机酸,或有机碱或无机碱,加成盐的形式。根据待治疗的病变和患者,以及给药途径,所述组合物可以以不同剂量施用。

[0157] 在对人的治疗中,本发明的抗体、抗原结合片段、和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体以及药物可以单独施用,但通常与根据给药途径和标准制药实践而选择的合适药物赋形剂、稀释剂或载体混合施用。

[0158] 例如,本发明的抗体、抗原结合片段、和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体以及药物可以以片剂、胶囊剂、栓剂(ovule)、酞剂、溶液或悬浮液的形式经口服、颊部或舌下施用,其可包含调味剂或着色剂,以用于速释、缓释或控释应用。本发明的抗

体、抗原结合片段、和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体以及药物还可以通过海绵体内注射施用。

[0159] 此类片剂可包含：赋形剂，例如微晶纤维素、乳糖、柠檬酸钠、碳酸钙、磷酸氢钙和甘氨酸；崩解剂，例如淀粉（优选玉米、马铃薯或木薯淀粉）、淀粉乙醇酸钠、交联羧甲基纤维素钠和某些复合硅酸盐；以及粒化粘合剂，例如聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素（HPMC）、羟丙基纤维素（HPC）、蔗糖、明胶和阿拉伯胶。此外，还可包含润滑剂，例如硬脂酸镁、硬脂酸、甘油山嵛酸酯和滑石。

[0160] 近似类型的固体组合物也可以用作明胶胶囊中的填充物。在此方面，优选的赋形剂包括乳糖（lactose）、淀粉、纤维素、乳糖（milk sugar）或高分子量聚乙二醇。对于水悬浮液和/或酞剂，本发明的抗体、抗原结合片段、和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体、药物和药物组合物可以组合多种甜味剂或调味剂、着色剂或染料，以及乳化剂和/或悬浮剂，以及稀释剂，例如水、乙醇、丙二醇和甘油，及其组合。

[0161] 本发明的抗体、抗原结合片段、和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体以及药物还可以经胃肠外施用，例如经静脉内、动脉内、腹腔内、鞘内、心室内、胸骨内、颅内、肌肉内或皮下施用，或者通过输注技术施用。其最好以无菌水溶液的形式使用，所述无菌水溶液包含其他物质，例如，足以使所述溶液与血液等渗的盐或葡萄糖。如果必要，所述水溶液应经过适当的缓冲（优选缓冲至pH3-9）。可通过本领域技术人员熟知的标准制药技术容易地在无菌条件下制备适合的胃肠外制剂。

[0162] 适合胃肠外施用的药物和药物组合物包括含水和无水的无菌注射溶液，其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂以及使所述制剂与目标受者血液等渗的溶质；还包括含水和无水的无菌悬浮液，其可包含悬浮剂和增稠剂。所述药物和药物组合物可以存在于单位剂量或多剂量的容器中，例如密封的安瓿和小瓶，并且可在冷冻干燥（冻干）的条件下贮存，仅需要在临用前添加无菌液体载体，例如注射用水。即用型注射溶液和悬浮液可以由此前描述的各种无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0163] 本发明的抗体、抗原结合片段、和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体以及药物还可以经鼻内或通过吸入施用，并以使用适合的推进剂由加压容器、泵、喷器或喷雾器喷送提供的干粉吸入剂或气雾剂形式方便地递送，所述适合的推进剂，例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷，氢氟烷，例如1,1,1,2-四氟乙烷（HFA134A3）或1,1,1,2,3,3,3-七氟丙烷（HFA227EA3），二氧化碳或其他适合的气体。在加压气雾剂的情况下，可通过提供阀门以递送经计量的量来确定剂量单位。所述加压容器、泵、喷器或喷雾器可包含所述活性剂的溶液或悬浮液，例如使用乙醇和所述推进剂的混合物作为溶剂，其还可包含润滑剂，例如脱水山梨醇三油酸酯。用于吸入器或吹入器中的胶囊和药筒（例如由明胶制成）可经配制而包含本发明的抗体、抗原结合片段、和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体和适合的粉末基质（例如乳糖或淀粉）的粉末混合物。

[0164] 优选地，气雾剂或干粉制剂的配置使得每个计量的剂量或每“喷”包含有效量的本发明制剂或多核苷酸以递送给患者。应理解，使用气雾剂的总日剂量对各个患者各不相同，并且可在全天中以单个剂量，或更常见地，以分开的剂量施用。

[0165] 可选地，本发明的抗体、抗原结合片段、和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体以及药物可以以栓剂或阴道栓剂的形式施用，或以洗剂、溶液、乳剂、凝胶、软

膏或粉剂的形式局部施用。本发明的抗体、抗原结合片段、和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体以及药物还可以透皮施用,例如,通过使用皮肤贴剂施用。其还可以通过经眼途径施用,特别是用于治疗眼睛的疾病。

[0166] 对于眼科应用,本发明的抗体、抗原结合片段、和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体以及药物可配制成为等渗的、pH经调节的无菌盐水中的微粉化悬浮液,或优选地,配制成为等渗的、pH经调节的无菌盐水中的溶液,并任选地,与诸如苯扎氯铵的防腐剂组合。或者,可将其配制在诸如矿脂的软膏中。

[0167] 对于皮肤的局部使用,可将本发明的抗体、抗原结合片段、和/或所述抗体、抗原结合片段的融合物、衍生物或变体以及药物配制成为包含所述活性剂的适合软膏,所述活性剂悬浮或溶于,例如包含以下一种或多种物质的混合物中:矿物油、液体矿脂、白矿脂、丙二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯剂,乳化蜡和水。或者,可将其配制成为适合的洗剂或乳剂,悬浮或溶于,例如以下一种或多种物质的混合物中:矿物油、脱水山梨醇单硬脂酸酯、聚乙二醇、液体石蜡、聚山梨醇酯60、十六烷基酯蜡、鲸蜡硬脂醇、2-辛基十二烷醇、苯甲醇和水。

[0168] 适合在口中局部施用的制剂包括包含在调味基(通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄芪胶)中的活性组分的糖锭(lozenge);包含在惰性基(例如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶)中的活性组分的锭剂(pastille),以及包含在适合的液体载体中的活性组分的漱口液。

[0169] 通常,对于人,口服或胃肠外施用本发明的抗体、抗原结合片段、和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体、药物和药物组合物是优选的途径,其最为便利。

[0170] 对于兽医使用,本发明的抗体、抗原结合片段、和/或所述抗体或抗原结合片段的融合物、衍生物或变体以及药物作为作为适合的可接受剂型,根据通常的兽医实践来施用,兽医可确定对具体动物最适合的给药方案和施用途径。

[0171] 本文定义的抗体或抗原结合片段、或所述抗体或抗原结合片段的变体、融合物或衍生物可如附属实施例中所述来制剂。

[0172] 如上文所述,当根据本发明方法和用途给药时,本文定义的抗体和/或抗原结合片段、和/或变体、融合物或衍生物能诱导癌和/或肿瘤细胞(诸如CD20-阳性和CD20-阴性多发性骨髓瘤细胞和肿瘤)的凋亡,和/或指导针对所述癌和/或肿瘤细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。另外,抗体和/或抗原结合片段、和/或变体、融合物或衍生物能结合可溶性细胞间粘附分子(sICAM-1),从而抑制血管生成、细胞粘附介导的抗药性和肿瘤细胞逃逸免疫监视。

[0173] 附属的实施例证明了,本文定义的示例性抗体(称为抗体“B11”,也称作BI-505)当根据本发明方法和用法给药时,具有显著性的体内和体外抗肿瘤(抗癌症)活性。除了其显著性的直接抗骨髓瘤活性外,B11还可起抑制血管生成驱动的肿瘤生长的作用,并抵抗肿瘤逃逸免疫监视。

[0174] 除非另有明确说明,本文使用的单数形式(“a”、“and”和“the”)包括复数的受试者。因此,例如“抗体”包括多个此类抗体,且所述“剂量”包括一个或多个剂量,以及本领域技术人员已知的等同物,等等。

## 实施例

[0175] 下列实施例体现了本发明的各种方面。应知道,实施例中所用的特异性抗体用于

说明本发明的原理,而非旨在限制其范围。

[0176] 参考附图描述下列实施例:

[0177] 图1显示了如何通过联合差异性生物淘选和程序性细胞死亡筛选来分离针对表达CD20的肿瘤具有显著体内抗肿瘤活性的新型ICAM-1抗体。(I)肿瘤相关受体特异性抗体的差异性生物淘选。(II)程序性细胞死亡(PCD)筛选。(III)靶鉴定。(IV)体内抗肿瘤活性。

[0178] 图1(I)显示了如何通过使用竞争性连续差异生物淘选方法得到对B淋巴瘤靶细胞具有选择性的抗体,其中全细胞形式的靶细胞抗原与膜囊泡形式的过量减数(subtractor)细胞抗原一起经受天然的n-CoDeR<sup>®</sup>抗体噬菌体文库。

[0179] 图1(II)显示了如何将高通量程序性细胞死亡筛选用于分离多种B细胞淋巴瘤PCD诱导的抗体。B细胞淋巴瘤细胞在有滴定浓度的候选抗体的条件下培养且过夜高度交联,并且在膜联蛋白V-AF488和碘化丙啶联合染色后用流式细胞仪监视凋亡。图1(II)(i)说明了膜起泡和细胞膜分别对功能上分离的BI-505抗体诱导的早期凋亡和晚期凋亡细胞的典型大分子的渗透性。图1(II)(ii)的图表示检测为膜联蛋白V-488阳性的死亡细胞百分数。

[0180] 图1(III)显示了如何在细胞裂解和全人源IgG免疫共沉淀接着用蛋白A琼脂糖凝胶交联的Raji或Ramos B淋巴瘤细胞上进行靶鉴定。切去抗体特异性条带并经胰蛋白酶消化,并通过MALDI-TOF分析。被BI-505沉淀的单一一条带被鉴定为ICAM-1。所建立的ICAM-1的身份通过超出可溶性重组ICAM-1或VCAM的高达50倍摩尔数的阻断研究确认。通过流式细胞仪确定BI-505对PC-3细胞的MFI。虚线代表阴性对照抗体,灰色实心直立图代表没有预先阻断的BI-505的MFI。BI-505被重组VCAM或ICAM-1预先阻断。图1(III)(iii)显示了如何用重组人ICAM-1、ICAM-2或ICAM-3包被ELISA平板,并且如何用化学发光方案检测BI-505与ICAM-1的结合。抗-ICAM-2和抗 $\alpha$ -ICAM-3抗体分别用作检测ICAM-2和ICAM-3的阳性对照。图1(IV)显示了为了进一步研究诱导PCD的ICAM-1抗体的治疗潜能,如何在移植两种良好表征的表达CD20的肿瘤B细胞系ARH-77或Daudi的免疫缺陷scid小鼠肿瘤模型中评价BI-505的体内抗肿瘤活性。

[0181] 图2:BI-505显示了在SCID/ARH-77骨髓瘤和Daudi异种移植模型中的显著体内抗骨髓瘤功效和效力。

[0182] 将肿瘤细胞皮下注射至SCID小鼠的左肋腹。从肿瘤细胞接种后第1天开始,小鼠每周两次接受剂量为20mg/kg、2mg/kg和/或0.2mg/kg的BI-505、对照抗体或利妥昔单抗的腹腔内注射。每治疗组有8至10只动物。(A)作为抗体剂量的函数的肿瘤体积。(B)作为抗体剂量的函数的Kaplan-Meier生存曲线图。(C)由流式细胞仪分析的表位表达。分别利用Graphpad Instat或Prism软件用Kruskal-Wallis检验(非参数ANOVA)与Dunn多重比较检验(肿瘤体积)或对数秩检验(小鼠生存曲线图)计算相对于对照抗体治疗的统计学显著性。统计学显著性确定为 $*p<0.05$ , $**p<0.01$ ,和 $***p<0.001$ 。

[0183] 图3:BI-505显示了在SCID/ARH-77骨髓瘤异种移植模型中的显著性体内抗骨髓瘤功效和效力。

[0184] 将肿瘤细胞皮下注射至SCID小鼠的左肋腹。从肿瘤细胞接种后第1天开始,小鼠每周两次接受剂量为0.02-20mg/kg的BI-505腹腔内注射。每治疗组有8至10只动物。(A)作为抗体剂量的函数的肿瘤体积。(B)作为抗体剂量的函数的Kaplan-Meier生存曲线图。分别利用Graphpad Instat或Prism软件用Kruskal-Wallis检验(非参数ANOVA)与Dunn多重比较检

验(肿瘤体积)或对数秩检验(小鼠生存曲线图)计算相对于对照抗体治疗的统计学显著性。统计学显著性确定为 $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ , 和 $***p<0.001$ 。图中表示的是进行几次实验中的代表性实验。(C)以肿瘤细胞系上的BI-505的表位饱和度作为BI-505浓度的函数作图。(D)在有交联的二级Fab'2山羊抗人Fc抗体的条件下,将Daudi B淋巴瘤细胞与BI-505或对照抗体一起孵育16小时,并且在用膜联蛋白V/碘化丙啶对细胞染色后,确定细胞死亡的诱导。以BI-505诱导的细胞死亡作为浓度的函数作图。该实验一式三份进行,且各实验重复至少5次。该图表示来自各实验( $n=5\times 3$ )的标准化的合并数据。(E)体内异种移植实验期间,在不同时间点收集血液样品并通过ELISA分析确定BI-505的波谷水平。以该体内抗肿瘤活性作为波谷BI-505血清浓度的函数作图,并用五参数对数-对数曲线和XLfit软件拟合。(F)体外抗肿瘤活性与BI-505表位饱和度之间的相关性。(G)体内抗肿瘤活性与BI-505表位饱和度之间的相关性。

[0185] 图4显示了多发性骨髓瘤患者具有显著性的BI-505表位表达。(A)多发性骨髓瘤患者特征和BI-505表位表达。(B)骨髓瘤细胞上与正常B细胞上的BI-505表位。

[0186] 图5显示了BI-505具有广谱和ICAM-1依赖性的体内抗骨髓瘤活性。

[0187] 第0天,将NCI-H929、EJM、RPMI-8226或OPM-2骨髓瘤细胞皮下注射至SCID小鼠的左胁腹。第1天,开始2mg/kg BI-505或对照IgG1的抗体治疗,且该治疗根据每周两次腹腔内给药方案继续进行。当肿瘤大小达到伦理限时处死小鼠。IgG B11对异种移植有ICAM-1阴性细胞系OPM-2的动物中的肿瘤生长没有影响,表明抗骨髓瘤活性是ICAM-1依赖性的。(A)显示了来自两个进行的实验中的一个代表性实验的数据(实心圆显示BI-505治疗,空心圆显示对照IgG1治疗)。(B)显示了来自两个独立实验的合并的且标准化的数据( $n$ =每治疗组8至10只动物。实心条显示BI-505治疗,空心条显示对照IgG1治疗)。用Mann Whitney非参数分析和Graph Pad Instat程序计算相对于对照抗体治疗的统计学显著性。统计学显著性确定为 $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ , 和 $***p<0.001$ 。

[0188] 图6:BI-505赋予了对晚期的实验性多发性骨髓瘤的保护。

[0189] 将ARH-77细胞或RPMI-8226静脉注射至SCID小鼠中。(A)ARH-77模型。动物在第7、10、13和16天接受2mg/kg抗体或0.5mg/kg硼替佐米(万科)静脉注射(如图中箭头所指)。(B)RPMI-8226模型。以2mg/kg静脉施用BI-505或对照单抗,每周两次,共8周;以1mg/kg静脉施用硼替佐米,每周一次,共8周;以2mg/kg口服来那度胺,共2个疗程,每一疗程包含5天治疗和2天洗出;以3mg/kg静脉施用美法仑,每周一次,共8周;和以6mg/kg/次注射地塞米松(DXH),3次/周,连续2周。每治疗组有6-10只小鼠。用对数秩Graphpad Prism软件计算统计学显著性,并确定在 $***p<0.001$ 。(C)为研究人细胞上的ICA-1水平,对来自不同器官的细胞染色,并对其进行CD38+/mCD45-/BI-505+门控处理。左小图表示CD38+/mCD45群中的BI-505阳性细胞百分数,而右小图表示阳性细胞的平均荧光强度。

[0190] 图7显示了BI-505Fc  $\gamma$  R结合能力与体外和体内抗肿瘤活性相关。

[0191] (A)将ARH-77细胞皮下注射至SCID小鼠的左胁腹( $n$ =每组8只)。用不同的BI-505同种型治疗小鼠,每周两次。(B)用Biacore确定BI-505同种型与不同重组Fc  $\gamma$  R的结合。BI-505IgG1而非IgG4或N297Q突变体显示了与小鼠Fc  $\gamma$  RIV(一种参与小鼠中Fc介导的活性的主要Fc受体)的强结合。(C)用不同比例的天然杀伤细胞为效应细胞和B淋巴瘤细胞系(CL-01)为靶细胞检查ADCC。如预期,仅BI-505介导肿瘤细胞的Fc  $\gamma$  RIIIA依赖性ADCC。(D)因为



带有不同亲和力的BI-505同种型结合人Fc $\gamma$ RIIIA(主要的人ADCC介导受体),观察到ADCC活性和抗肿瘤功效之间的相关性。(E)对来自治疗小鼠的ARH-77异种移植组织染色,并定量F4/80阳性区域,所述阳性区域显示出了在BI-505治疗的小鼠中对肿瘤组织的巨噬细胞浸润显著高于在利妥昔单抗和对照IgG治疗的小鼠中的浸润。误差线=40 $\mu$ m。图中显示了所测量的组织中F4/80阳性区域的百分数。用Kruskal-Wallis检验(非参数ANOVA)与Dunn多重比较检验计算相对于对照抗体治疗的统计学显著性。统计学显著性确定为\*p<0.05,\*\*p<0.01,和\*\*\*p<0.001。

[0192] 图8显示了与利妥昔单抗相比,BI-505/IgG B11在(A)ARH-77和(B)Daudi异种移植模型中的高功效和效力。

[0193] 图9显示了经由免疫组化分析,BI-505、利妥昔单抗或者对照治疗的肿瘤都表达类似显著量的CD20和ICAM-1抗体靶向的表位。

[0194] 图10显示了(A)MM骨髓细胞的免疫表型染色组。(B)显示了用于选择CD38、CD138和CD56高表达和CD45缺失的流式细胞术分析,确认了单克隆表达。之后检测患者#7(+),#8(++)和#10(+++)B11表位表达。(C)显示了患者(1)、复发后(2)和复发治疗后(3)的骨髓瘤细胞中的B11表位表达。

[0195] 图11显示了所产生的BI-505同种型交换变体的靶蛋白结合亲和力EC<sub>50</sub>值几乎一致。

[0196] 图12显示出B细胞凋亡、T细胞增殖、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和细胞因子释放(特别是TNF- $\alpha$ 和IL-8)都未被B11治疗显著影响。

[0197] 图13显示出与对照治疗小鼠(p<0.001)相比和与四种不同的SOC治疗(p<0.05,与雷利米得或万科相比;p<0.001,与地塞米松或爱克兰相比)相比,BI-505显著增强了播散性MM异种移植模型中的生存时间。N=6-10/组。

[0198] 图14显示了标准治疗药物对异种移植有播散性MM细胞的小鼠的治疗既未影响表达ICAM-1的MM细胞数量(A),也未影响ICAM-1表达水平(B)。

[0199] 图15显示了B11抗体可变区重链(B11-VH)和可变区轻链(B11-VL)核苷酸和氨基酸序列。

[0200] 实施例1:本发明所用的材料和方法

[0201] 试剂、细胞和动物

[0202] 若干批次的IgG<sub>1</sub> B11要么稳定地表达自CHO细胞,要么在HEK293细胞中瞬时表达。IgG<sub>4</sub> B11和297Q B11在HEK293细胞中瞬时表达。对照抗体IgG<sub>1</sub>CT17或IgG<sub>1</sub>FITC-8GA在HEK293细胞中瞬时表达。通过LAL-变形细胞检验测定,抗体的内毒素水平为<0.1IU/mL。利妥昔单抗(Roche)、硼替佐米(Janssen-Cilag)、来那度胺(celgene)、美法仑(GlaxoSmithKline)和地塞米松(Mylan)购自当地药店(瑞典隆德和法国第戎)。ARH-77、RPMI-8226和Daudi细胞系购自美国典型培养物保藏中心(ATCC,瑞典),NCI-H929、EJM和OPM-2细胞系购自德国微生物菌种保藏中心(DSMZ,德国)。所有细胞维持在供应商推荐的培养基中。在富集细胞用于异种移植前,确保细胞的对数期生长。CT.17背景的雌性scid小鼠获自丹麦泰康利,以7-8周龄用于随后的研究。根据动物实验伦理指导原则进行动物实验,并且所有使用动物的操作程序均由当地的隆德/马尔摩伦理委员会审查和批准。

[0203] 多发性骨髓瘤患者细胞的ICAM-1的表达分析

[0204] 知情同意后,在当地的伦理委员会批准下,用识别浆细胞的四种抗体组(见实施例2)通过流式细胞术分析来自隆德的Skanes大学医院血液科的被研究多发性骨髓瘤或关联疾病(浆细胞瘤、浆细胞白血病、淀粉样轻链淀粉样变性)的十八例患者的骨髓抽取物。临床数据获自病例表(图4A)。

[0205] 程序性细胞死亡(PCD)试验

[0206] 在96孔培养板上,以 $2 \times 10^6$ 个细胞/mL培养基的密度接种靶细胞。在没有或有用于交联的抗人Fab片段(Jackson ImmunoResearch)的条件下,将滴定浓度的IgG1 B11或不同阴性和阳性对照抗体添加至细胞中。然后于37°C,5%CO<sub>2</sub>的增湿氛围中孵育细胞16小时。收集细胞并用膜联蛋白V-488/碘化丙啶(Invitrogen, Sweden)染色,并用流式细胞仪(FACS Calibur, BD生命科学)分析。

[0207] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)

[0208] 来自人供体的血沉棕黄层(Buffy coat)(通过隆德Blodcentralen订购)用于分离外周血单核细胞(PBMC)和随后的NK细胞。简言之,用Ficoll Paque PLUS(Amersham Biosciences, Sweden)在LeucoSep管(Greiner Bio-One)中分离外周血组分。移取PBMC部分,并在用阳性或阴性NK细胞分离试剂盒与MACS LS柱(Miltenyi Biotec)进行磁珠标记和NK细胞群分离前,在冰预冷的DPBS(Invitrogen)中充分洗涤。获得的NK细胞级分的纯度在用 $\alpha$ -CD56抗体(BD Biosciences)染色后用流式细胞术分析。收集靶细胞,并在含或不含各抗体(2 $\mu$ g/mL)的培养基中在冰上孵育60分钟。其后洗涤细胞并重悬在冰预冷的培养基中,之后分入FACS管中。然后,在ADCC培养基中稀释分离的NK细胞,并以不同效应细胞/靶细胞比例(40:1、20:1、5:1和1:1),将其与各抗体包被的靶细胞分配在一起。所有实验均以一式三份进行。在孵育完全后,加入ToPo-Pro-3染料和计数珠(Invitrogen),并用流式细胞术分析细胞的膜渗透性。

[0209] 完全依赖性细胞毒性(CDC)

[0210] 收集靶细胞并在含5 $\mu$ g/mL或在0.01-100 $\mu$ g/mL的滴定浓度的抗体的RPMI培养基中在冰上孵育60分钟。其后洗涤细胞并重悬在预冷的培养基中,之后分入流式细胞管中。以一式三份进行处理。将正常或热灭活的人血清(Sigma, Sweden)加入管中,并在37°C孵育样品2小时。在孵育完全后,以0.3 $\mu$ M的终浓度加入ToPo-Pro-3,并用流式细胞术分析细胞的膜渗透性。

[0211] 结合Fc $\gamma$  R的BI-505同种型变体

[0212] 在贴壁的HEK293E细胞中瞬时表达带有His标签的人Fc $\gamma$  RIIIa或小鼠Fc $\gamma$  RIV,用Ni-NTA色谱法纯化,并用SDS-PAGE和/或Biacore表征。用Biacore3000仪器进行表面等离子体共振(SPR)测量。用标准氨基偶联操作规程将山羊 $\alpha$ 人F(ab)'<sub>2</sub>(ab)'<sub>2</sub>片段(Jackson laboratories)固定在CM-5芯片上。将IgG1 B11、IgG4 B11或297Q B11分别稀释至15和60 $\mu$ g/mL,并以10 $\mu$ L/分钟加至表面,共3分钟。将带有His标签的人Fc $\gamma$  RIIIa或小鼠Fc $\gamma$  RIV与 $\alpha$ -His抗体(R&D Systems)以2:1的摩尔比一起预孵育,之后加至芯片表面,30 $\mu$ L/分钟,共1分钟。每一轮处理后,用pH1.7的甘氨酸缓冲液再生表面两次。

[0213] 肿瘤生长

[0214] 皮下移植:

[0215] 在骨髓瘤细胞接种前,用七氟烷和氧气的混合物麻醉小鼠,然后以100 $\mu$ L体积将1-

$5 \times 10^6$ 骨髓瘤细胞皮下注射入左肋腹。在细胞接种后一天(预防性模型)或在肿瘤达到近 $100\text{mm}^3$ 的大小时(疾病建立模型),开始通过腹腔内(i.p.)注射进行抗体治疗。在总体积为 $200\mu\text{L}$ 的PBS中进行抗体给药。PBS或同种型对照治疗用作对照。用数字卡尺测量肿瘤,并根据公式:宽度<sup>2</sup>×长度×0.52计算肿瘤体积。当肿瘤大小达到1.5cm的伦理限时处死动物。在最多5个月后,处死存活的小鼠。从腔静脉中收集的血液样品在 $2500g$ 离心15分钟,以获得血清,在 $-20^\circ\text{C}$ 下保存样品。移取肿瘤用于免疫组化,快速冷冻并在 $-85^\circ\text{C}$ 下保存。

[0216] 播散性多发性骨髓瘤模型:

[0217] 在播散性多发性骨髓瘤模型中检查BI-505的抗骨髓瘤效果。在法国第戎的OncoDesign进行早期和晚期播散性多发性骨髓瘤模型的建立。简言之:将在 $200\mu\text{L}$  RPMI 1640中的 $1 \times 10^6$ (早期)或 $5 \times 10^6$ (晚期) ARH-77肿瘤细胞静脉(i.v)注射入雌性scid小鼠的尾静脉(D0)。在小鼠的全身辐射后( $1.8\text{Gy}$ ,  $^{60}\text{Co}$ , INRA, BRETENNIERES)24至48小时,进行肿瘤细胞注射。于D5(RPMI-8226模型)或D7(ARG-77模型)开始治疗,美法仑除外(它于D10给药)。以 $2\text{mg/kg}$ 静脉施用B11或对照单抗,每周两次,共8周,以 $1\text{mg/kg}$ 静脉施用硼替佐米,每周一次,共8周,以 $2\text{mg/kg}$ 口服来那度胺,共2个疗程,每个疗程包括5天治疗和2天洗出,以 $3\text{mg/kg}$ 静脉注射美法仑,每周一次,共8周,和以 $6\text{mg/kg}$ 注射地塞米松,连续2周。

[0218] 统计学分析

[0219] 如图例所述,用Kruskal-Wallis检验(非参数ANOVA)与Dunn多重比较检验或Mann Whitney非参数分析计算相对于对照抗体治疗的统计学分析。用对数秩和检验和Graphpad Prism软件计算抗体介导的小鼠生存时间的统计学分析。统计学显著性确定为 $*=p<0.05$ ,  $**=p<0.01$ ,  $***=p<0.001$ 。

[0220] 实施例2:通过联合的差异生物淘选和程序性细胞死亡筛选分离的新型ICAM-1抗体在体内对表达CD20的肿瘤具有竞争性抗肿瘤活性

[0221] 如图1所示,应用连续差异生物淘选和高通量程序性细胞死亡筛选(参见实施例1)从体外的CDR重排的天然人抗体文库n-CoDeR(Biolvent)中分离靶向不同肿瘤细胞相关表面受体的诱导多发性B细胞淋巴瘤程序性细胞死亡(PCD)的抗体。在所分离的抗体中,鉴定了对ICAM-1(一种先前不与抗体诱导的肿瘤PCD相关的受体)具有特异性的那些抗体。在表达CD20的肿瘤细胞系和CD20阴性肿瘤细胞系中,抗ICAM-1抗体均诱导了PCD,表明其广谱的治疗应用性。IgG B11对ICAM-1的高特异性及其在表达ICAM-1的Daudi淋巴瘤细胞中的剂量依赖性PCD诱导示于图1中。

[0222] 为了进一步研究诱导PCD的ICAM-1抗体的治疗潜能,在移植两种良好表征的表达CD20的B细胞恶性肿瘤细胞系ARH-77或Daudi的免疫缺陷scid小鼠的肿瘤模型中评价了IgG B11的体内抗肿瘤活性(图1组IV)。这些细胞系分别广泛用于研究多发性骨髓瘤(24-48)和非霍奇金淋巴瘤(49,50)不同模型中的药物功效和效力。两种细胞系均表达CD20抗原,使得与临床有效的CD20特异性抗体利妥昔单抗的抗肿瘤功效和效力的比较成为可能。

[0223] ARH-77细胞的皮下注射导致了肿瘤细胞在scid小鼠中的快速建立和生长,在肿瘤细胞注射后12与14天之间,肿瘤易于触及。开始于肿瘤细胞接种后第1天的 $20\text{mg/kg}$ 剂量的IgG B11的每周两次注射显现出完全阻止异种移植小鼠中的肿瘤生长(图2A左小图)。CD20特异性阳性对照单抗利妥昔单抗也赋予了显著的抗肿瘤活性,尽管比IgG B11疗效差。而且,即使以低至利妥昔单抗十分之一的剂量( $2\text{mg/kg}$ )给药时,IgG B11也赋予了全部的存活

(图2A和2B,左小图)。因此,在此侵袭性CD20阳性B细胞恶性肿瘤模型中,IgG B11在赋予抗肿瘤活性和存活上比利妥昔单抗更有效,效力更高。

[0224] 接下来研究IgG B11对Daudi非霍奇金淋巴瘤异种移植物的体内抗肿瘤活性。同样,在此模型中,IgG B11显著地且与利妥昔单抗同等有效地阻止肿瘤生长并延长了荷瘤小鼠的生存时间(图2A和2B,右小图)。IgGB11的增强的抗肿瘤活性并不是由表达比利妥昔单抗表位更多数量的B11的肿瘤细胞所致。相反,流式细胞术分析揭示了ARH-77和Daudi细胞两者均表达比利妥昔单抗表位低得多的ICAM-1(图2C左小图和右小图)。这些结果证明了IgG B11对两种不同的良好表征的表达CD20的肿瘤细胞系具有显著的体内抗肿瘤活性。

[0225] 接着用scid/ARH-77模型系统进行了剂量滴定实验以建立IgG B11体内效力和实现最大的抗肿瘤活性的最低剂量。IgG B11显示了可滴定的抗肿瘤活性,该抗肿瘤活性遵循S曲线且峰值在2mg/kg剂量,并在0.2mg/kg剂量处仍接近最大值(图3A)。在实验末期,通过ELISA测定小鼠血清抗体波谷浓度。然后针对体内抗肿瘤活性最大值的百分数,并针对ICAM-1受体占有率和体外在相应抗体浓度处的肿瘤细胞PCD的最大值的百分数对波谷抗体浓度作图(图3C,3D,3E,3F和3G)。惊奇的是,观察到了抗体浓度与体外肿瘤细胞受体占有率、体外肿瘤细胞PCD和体内抗肿瘤活性之间的接近完美的相关性,这与隐含在体内抗肿瘤活性中的ICAM-1依赖性的直接细胞毒性一致。

[0226] 在类似但更晚期的scid/ARH-77异种移植模型中证实了IgG B11的高功较和效力(图8A)。荷载可触及的ARH-77肿瘤的Scid小鼠以不同剂量的IgG B11、利妥昔单抗或对照抗体治疗。在此模型中,利妥昔单抗未能降低肿瘤生长或提高动物生存时间( $p>0.05$ )。相比之下,与利妥昔单抗治疗相比,即使以更低的百分之一的剂量(0.2mg/kg)给药时,IgG B11也显著地阻止肿瘤生长并延长了动物生存时间(图8A)。在晚期肿瘤模型中,利妥昔单抗抗肿瘤效果的缺乏不是肿瘤逃逸或抗原表达下调造成的。在实验完成时,从抗体和对照治疗小鼠中收集的肿瘤组织的免疫组化分析揭示了整个实验中肿瘤表达类似、显著数量的CD20和ICAM-1抗体靶向表位(图9)。

[0227] 实施例3:ICAM-1和B11在包括多发性骨髓瘤在内的淋巴增生性疾病广泛表达

[0228] ICAM-1 B11 IgG的高功效和效力的体外和体内抗肿瘤活性激发了申请人全面评估ICAM-1在不同淋巴增生性疾病中的表达。首先,通过组织微阵列免疫组化分析测定了在慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、滤泡细胞淋巴瘤(FCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)和播散性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)中的ICAM-1表达(表1)。

[0229] 表1.淋巴瘤中的ICAM-1表达

[0230] 淋巴瘤MTA中的ICAM-1表达

[0231]

|               | CLL        | FCL         | MCL       | DLCBL       |
|---------------|------------|-------------|-----------|-------------|
| 表达 ICAM-1 的组织 | 27% (9/33) | 95% (40/42) | 89% (8/9) | 98% (47/48) |
| 阳性组织中的阳性细胞%   | 23         | 56          | 23        | 81          |
| 相对强度等级 0-3    | 0.8        | 1.4         | 1.0       | 1.3         |

[0232] ICAM-1在27%的CLL,95%的FCL,89%的MCL和98%的DLBCL中以相对于阳性对照扁桃体组织的中至强的程度表达(表1)。

[0233] 先前的报道描述了ICAM-1与多发性骨髓瘤疾病进展之间的强相关性,ICAM-1在骨髓瘤中自身高表达,并且在晚期疾病和对化疗具有抗性的多发性骨髓瘤(MM)患者中上调(14,22,51)。

[0234] 基于这些观察结果,通过流式细胞术评价了多发性骨髓瘤患者和相关疾病(浆细胞瘤、浆细胞白血病、轻链淀粉样变性)中的骨髓细胞上的ICAM-1B11表位表达(图4)。根据欧洲多发性骨髓瘤的多参数流式细胞术指导原则网络,基于CD38/CD138/CD45和CD56表达鉴定骨髓瘤细胞(Rawstron et al Haematologica(2008),93,第431-438页)。

[0235] 流式细胞术染色组

[0236] 在Skanes大学医院血液科根据当地的常规方法,在局部麻醉下(10mL赛罗卡因),从髂嵴中取约5-7mL的骨髓抽吸物。根据制造商说明书,通过FACSlysis(Becton Dickinson,Stockholm,Sweden)从骨髓细胞中去除红细胞,然后用四组抗体染色,如表A(图10)中所示。在组4中,在用BD的Perm Fix透化和对 $\kappa$ 和 $\lambda$ 轻链的内染色后进行表面染色,以确认多发性骨髓瘤细胞的单克隆性。

[0237] 来自多发性骨髓瘤患者的骨髓中的骨髓瘤细胞分析

[0238] 用FACSS Canto II通过流式细胞术分析染色的骨髓细胞(图10B)。基于CD138和CD38高表达对骨髓瘤细胞进行门控处理,并通过CD56高表达和CD45表达缺失进一步确认。进而,通过 $\kappa$ 和 $\lambda$ 染色,用细胞内染色确认单克隆表达。如直立方图(右侧)中所示,将B11表位表达进行分类,(+),(++)和(+++)对应于#8、#7和#10患者。B11阴性细胞(-)是来自#8患者的B细胞(图10B)。

[0239] 患有多发性骨髓瘤的患者疾病进展过程中骨髓瘤细胞的B11表位表达

[0240] 提取诊断患有多发性骨髓瘤的79岁老年男性的骨髓浆细胞(骨髓号1)。用口服美法仑和地塞米松冲击(6个疗程)联合连续的沙利多胺开始治疗,具有显著响应。然而,治疗结束后两月,患者复发(骨髓号2)。这次,患者接受了两个疗程的环磷酰胺和地塞米松冲击,之后对骨髓进行新的评价(骨髓号3)。BI-505在骨髓瘤细胞中的平均表达在首次复发后增加了2倍(直立方图,右)(图10)。

[0241] 所有骨髓瘤患者均在骨髓瘤细胞上表达ICAM-1 B11表位。骨髓瘤细胞上的ICAM-1 B11的表达水平一般极高,平均表达水平为患者正常B细胞的17倍(图4)。进而,ICAM-1 B11表位在已接受几种不同系疗法的复发患者的骨髓瘤细胞上看起来也是高表达。

[0242] 得出的结论是,ICAM-1在几种淋巴增生性疾病中强表达,包括FCL和DLBCL,并且ICAM-1 B11表位由多发性骨髓瘤浆细胞强表达。

[0243] 实施例4:IgG B11具有广谱的体内抗骨髓瘤活性

[0244] 基于所观察到的B11表位有多发性骨髓瘤中的高表达,先前报道的ICAM-1与多发性骨髓瘤和对当前治疗的抗性的相关性,和B11对表达CD20的恶性B细胞肿瘤的明显且显著性的体内抗肿瘤活性,我们接着评估IgG B11在scid/异种移植模型中的体内抗骨髓瘤活性,所述模型包括四种不同的良好表征的多发性骨髓瘤细胞系。这些细胞系表达骨髓瘤标记CD38和CD138,但不表达CD20。每周两次,2mg/kg剂量的IgG B11分别将异种移植有表达ICAM-1的细胞系EJM、RPMI-8226和NCI-H929的小鼠中的骨髓瘤肿瘤生长减少了98%、96%和

99%(图5A和5B,  $p_{EJM} < 0.000009$ ,  $p_{RPMI-8226} < 0.0037$ ,  $p_{NCI-H929} < 0.0002$ )。相比之下, IgG B11不影响异种移植有ICAM-1阴性细胞系OPM-2的小鼠中的肿瘤生长(图5A和B,  $p_{OPM-2} > 0.05$ )。总之, 这些研究证明了IgG B11的高效、广谱和ICAM-1依赖性体内抗骨髓瘤活性。

[0245] 实施例5:与当前所用的治疗相比, IgG B11在晚期多发性骨髓瘤的播散性实验模型中赋予了增加的生存时间

[0246] Scid/ARH-77的播散性模型是已经建立好的在多个方面模拟人多发性骨髓瘤疾病进展和疾病表现的实验模型(33)。我们利用了此模型以进一步表征IgG B11的抗骨髓瘤活性(图6A)。对辐射后的scid小鼠静脉注射 $1 \times 10^6$  ARH-77细胞先前显示出导致其小鼠骨髓中的播散和建立, 且导致溶骨性骨损害和高血钙, 并最终导致动物瘫痪或呼吸困难, 此时立即处死动物。

[0247] 从静脉注射骨髓瘤细胞后7天开始, 动物接受了蛋白酶体抑制剂硼替佐米(“万科”)、IgG B11、对照IgG或盐水的四种连续性治疗。肿瘤细胞注射后第22天, 对照治疗的动物开始显示显著的体重减轻(3天期间 $>15\%$ ), 或者瘫痪, 不得不处死(图6A)。对照治疗的小鼠进行性地发生多发性骨髓瘤的症状, 且肿瘤细胞注射后, 存活不过39天。与对照治疗相比, 蛋白酶体抑制性药硼替佐米(万科)非显著性地延迟了疾病发生, 且未显著性地增加动物生存时间( $p_{BZ比盐水} < 0.554$ ,  $p_{BZ比对照IgG} < 0.2509$ )。相比之下, 与对照或万科治疗相比, IgG B11的治疗显示了巨大的抗肿瘤效果, 症状性疾病出现的时间为两倍, 平均生存时间增加( $p_{BZ比盐水} < 0.0001$ ,  $p_{BZ比对照IgG} < 0.0001$ )。这些p值证明了各治疗间在动物的肿瘤生长及生存时间上的统计学显著性差异。

[0248] 在类似的包含RPMI-8226骨髓瘤细胞的晚期播散性多发性骨髓瘤模型中进一步检测了IgG B11与当前所用的治疗相比的抗骨髓瘤活性(图6B)。在此模型中, 与硼替佐米的治疗相比和与地塞米松的治疗相比, IgGB11的治疗显著性增加了生存时间且延迟了疾病发生, 以两种临床相关的剂量给药的药物显示出了最大体内治疗性效果, 且无明显的毒性。进而, 与免疫调节性药物雷利米得治疗的小鼠相比, IgG B11治疗的小鼠中有改善生存时间的趋势。

[0249] 为研究人细胞上的ICAM-1水平, 将来自不同器官的细胞染色, 并进行CD38+/mCD45-/BI-505+门控处理。图6C显示了CD38+/mCD45群中的BI-505阳性细胞百分数和阳性细胞的平均荧光强度。

[0250] 骨髓瘤细胞上的ICAM-1表达的检测

[0251] 在处死小鼠时, 采集用于FACS分析的器官, 通过机械分离和分散酶/胶原酶(Gibco, 法国)的酶消化从组织中制备细胞。用抗人CD38抗体(PerCP-Cy5, Becton Dickinson)、抗小鼠CD45(PE, Becton Dickinson)和人ICAM-1(BI-505IgG1 AF647, BioInvent)对细胞染色, 并在黑暗中室温孵育15分钟。孵育后, 洗涤细胞两次, 并用勃艮第大学流式细胞设施的流式细胞仪装置(LSR II)分析细胞表面荧光。

[0252] 实施例6: IgG B11体内和体外抗肿瘤活性是Fc依赖性的, 且与对小鼠和人Fc  $\gamma$  受体的结合相关

[0253] 先前的研究证明了IgG B11在一系列B细胞恶性肿瘤细胞系中的广谱而强劲的PCD诱导性质(10)。然而, 先前没有研究其参与细胞效应因子机制的能力。考虑到IgG B11的极为强劲而有效的体内抗肿瘤活性, 和Fc  $\gamma$  R介导的抗肿瘤机制对于临床上验证过的包括利

妥昔单抗在内的癌症单抗的临床和体内治疗性活性的至关重要性(52)(53)(54),接下来证明了抗体Fc:宿主Fc  $\gamma$  R依赖性的机制有助于IgG B11治疗性活性。

[0254] 为此,生成了具有文献记载的对人Fc  $\gamma$  R的差异亲和力(55)和参与人Fc  $\gamma$  R依赖性抗肿瘤活性的差异能力(56)的人IgG1、IgG4和Fc  $\gamma$  R结合缺陷性突变IgG1(N297Q IgG1)同种型转换变体,并研究了它们各自与其Fc  $\gamma$  R结合性质相关的体内治疗性效果。通过它们的几乎相同的结合重组或细胞表面表达的靶蛋白的EC<sub>50</sub>值证明所生成的同种型转换变体对靶抗原的保留的亲和力(图11)。

[0255] 令人惊讶的是,IgG B11同种型转换变体的抗肿瘤活性与对m Fc  $\gamma$  RIV(赋予抗体介导的体内细胞毒性的人Fc $\gamma$ RIIIa和主要的小鼠Fc  $\gamma$  R的结构和功能同源物)的结合高度完全相关,并且以IgG1<sub>N297Q</sub><IgG4<IgG1的次序增加(图7A和7B上小图)。重要的是,在实验结束时,B11的IgG1、IgG4或IgG1<sub>N297Q</sub>变体抗体治疗的小鼠具有类似的血清抗体效价(表2),表明不同的变体具有类似的体内半衰期,且证明差异性抗肿瘤活性并非由药代动力学上的不同所致。

[0256] 表3: IgG1、IgG4或N297Q突变体治疗的小鼠的血清抗体效价

| 体内 IgG 水平 (μg /mL) |          |             |           |     |
|--------------------|----------|-------------|-----------|-----|
| 剂量 (mg/kg)         | IgG1     | IgG4        | N297Q 突变体 |     |
| [0257]             | 20 ± 2.9 | 13 + 3.1    | 9.6 ± 3.  |     |
|                    | 0.2      | 1.2 ± 0.4   | NDA       | NDA |
|                    | 0.02     | 0.06 ± 0.02 | NDA       | NDA |

[0258] NDA=未能获得数据

[0259] 而且,对肿瘤组织的免疫组化分析证明,与对照IgG治疗和未治疗小鼠相比,且有趣地与利妥昔单抗治疗的小鼠相比,在IgG B11治疗的小鼠中有大量流入的F4/80+宿主效应细胞(图7E)。这些发现表明Fc:Fc  $\gamma$  R依赖性的宿主效应细胞介导的机制显著性地促成IgG B11体内抗肿瘤活性。

[0260] 为确认Fc:Fc  $\gamma$  R依赖性机制在IgG B11抗肿瘤活性中的作用,检查了其介导对于人靶肿瘤细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的能力。如预期,在具有人天然杀伤效应细胞的条件下,IgG B11IgG1结合人Fc  $\gamma$  RIIIIa且介导对靶肿瘤细胞的ADCC(图7C)。相比之下,B11IgG4和IgG1<sub>N297Q</sub>变体不结合人Fc  $\gamma$  RIIIIa,且不介导对靶肿瘤细胞的ADCC。因此,与体内环境类似,IgG B11体外介导的ADCC是Fc依赖性的,且与对主要的介导人ADCC的受体Fc  $\gamma$  RIIIIA的结合相关(图7D)。除Fc:Fc  $\gamma$  R依赖性的抗肿瘤机制外,癌症单抗Fc依赖性的抗肿瘤活性可由通过所谓的补体依赖性细胞毒性(CDC)的补体级联活化所致。因此在一组表达ICAM-1的肿瘤细胞系中检查了IgG B11诱导CDC的能力。IgG B11在所监测的肿瘤细胞系中均不诱导CDC。相比之下,如先前所报道的,阳性对照利妥昔单抗治疗有效地诱导了CDC(57-59)。

[0261] 实施例7: IgG B11对正常的表达ICMA-1的细胞无体外细胞毒性

[0262] 在正常生理环境下,血管内皮、上皮细胞、成纤维细胞、角化细胞、白细胞以及常规

抗原递呈细胞(APC)上低水平组成性表达ICAM-1(60)。然而,ICAM-1表达由几种细胞因子和促炎剂上调,包括响应创伤或炎症响应期间释放的IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、脂多糖(LPS)、氧自由基和低氧(60,61),引发关于像IgG B11的抗ICAM-1抗体治疗的安全性问题。

[0263] 基于文献记载的IgG B11赋予恶性B细胞的程序性细胞死亡和ADCC的能力,和所提出的补体活化在抗体耐受性方面的总体上的负作用(Lim等2010Haematologica95,第135-143页),因此在表达ICMA-1的正常(非转化的)人外周血B细胞和内皮细胞中检查了IgG B11的程序性细胞死亡诱导、ADCC或CDC效应(图12)。外周血B细胞和初始B细胞显示出ICAM-1的低内源性表达,而人脐带静脉内皮细胞(HUVEC)和人皮肤微血管内皮细胞(HMVEC)显示出显著的ICAM-1表达,这通过流式细胞分析确定该表达在对IFN- $\gamma$ 刺激的响应中进一步上调。

[0264] 然而,IgG B11在所检测的静息或活化的正常ICAM-1表达细胞类型中均不诱导PCD(图12)。相比之下,如预期,用紫杉醇对内皮细胞的处理和用阳性对照抗HLA-DR或抗CD20抗体对B细胞的处理分别诱导了显著的内皮细胞和B细胞程序性细胞死亡。类似地,IgG B11未赋予HUVEC、HMVEC或外周血B细胞的ADCC或CDC(图12)。

[0265] 实施例8:IgG B11不调节体外的外周血单核细胞(PBMC)细胞因子释放或T细胞增殖

[0266] 接着评估了IgG B11对PBMC细胞因子释放和细胞增殖的影响。为了尽可能鉴定IgG B11的任意PBMC拮抗性质,使用两种不同的抗体包被方案,其中如先前所述,抗体高度交联(62)。通过任一方案固定的IgG B11诱导了Daudi淋巴瘤细胞的程序性细胞死亡,证明固定后仍保留了生物学活性。然而,通过任一固定方案或在有或无交联剂的条件下将其加入溶液中时,IgG B11却不诱导PBMC细胞因子释放,且不诱导细胞增殖(图12)。

[0267] 相比之下,如预期,用固定的阳性对照抗CD3抗体孵育PBMC导致了显著性的PBMC的IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 的释放(图12)。类似实验证明加入溶液中的IgG B11不诱导或增强自静息或脂多糖预刺激的PBMC的细胞因子释放,且不诱导细胞增殖(图12)。

[0268] 实施例9:抗ICAM-1抗体在播散性多发性骨髓瘤中比标准治疗具有更好的体内效果,且ICAM-1表达自身不受此标准治疗影响

[0269] 细胞系

[0270] RPMI8226获自Pharmacell(法国),ARH-77获自ATCC。肿瘤细胞在增湿氛围中(5%CO<sub>2</sub>,95%空气)于37℃下悬浮生长。对于两种细胞系,培养基均为补充有10%胎牛血清的含2mM L-谷氨酰胺的RPMI1640。对于ARH-77,它还补充有25mM HEPES,1mM丙酮酸钠和终浓度为4.5g/L的葡萄糖。对于体内肿瘤研究,在增殖状态时收集细胞,并用0.25%台盼蓝排除法检查活力。

[0271] 动物

[0272] 雌性CB-17SCID scid/scid小鼠(6-8周龄),获自CHARLES RIVER(L'Arbresles,法国)或Taconic(丹麦),并在SPF动物房中任意给食物和水喂养。所用动物实验均根据伦理指导方针进行。实验开始前,观察小鼠最少7天。

[0273] 播散性RPMI-8226体内模型

[0274] 将200 $\mu$ L10 $\times$ 10<sup>6</sup>RPMI8226肿瘤细胞静脉注射至雌性SCID小鼠的尾静脉中。细胞注射前24至72小时,已经给小鼠进行了小鼠全身辐射(1.8Gy,<sup>60</sup>Co,BioMEP)。第1天,注射肿瘤



的小鼠根据其个体体重随机分组。所有治疗均在施用肿瘤细胞后第5天开始,爱克兰<sup>®</sup>除外(第10天开始)。以10ml/kg/次的剂量体积进行所有治疗的注射。小鼠接受下列治疗之一:

[0275] 以在PBS的溶液中2mg/kg的含量进行单克隆抗ICAM单抗或对照单抗的静脉给药,2次/周,连续8周。

[0276] 将万科<sup>®</sup>(硼替佐米,3.5mg,Janssen-Cilag)溶于0.9%NaCl中,其后分装并在-20℃保存。在注射前解冻一支,其后弃去。小鼠接受0.5、1或2mg/kg的静脉注射,1次/周,连续8周。

[0277] 雷利米得<sup>®</sup>(来那度胺,5mg/胶囊,Celgene)胶囊首先溶于DMSO中,其后稀释至为5%DMSO(0.2%HC11N(Sigma)、5%吐温80(Sigma)和89.8%NaCl0.9%)的终浓度。在每一治疗日,溶液新鲜配制。以1、2或3mg/kg口服治疗小鼠,共2个疗程,每个疗程包括5天治疗和2天洗出。

[0278] 爱克兰<sup>®</sup>(美法仑,50mg,GlaxoSmithKline)通过将含50mg爱克兰<sup>®</sup>的管与补充载体混合而制备,其后分装并在-20℃保存。每次给药前,解冻一支并在0.9%NaCl中稀释,且以3、6或12mg/kg静脉注射,1次/周,连续8周。

[0279] 地塞米松<sup>®</sup>(4mg/ml,Mylan)在0.9%NaCl中稀释。在每一治疗日,制备新鲜的工作液。小鼠接受2、4和6mg/kg/次注射,3次/周,连续2周。

[0280] 终止生命,ICAM-1表达

[0281] 每天记录小鼠的健康状态和行为,每周两次记录小鼠的体重。如果它们显出恶液质、化合物毒性、后足瘫痪或严重体重减少的迹象,终止小鼠生命。一旦生命终止,采集骨髓、脊髓、肾上腺和肾脏,并检查其肿瘤细胞上的ICAM-1表达。为区分人与小鼠来源的细胞,使用了抗小鼠CD45单抗。因此,MM细胞被定义为CD38<sup>+</sup>/mCD45<sup>-</sup>(Becton Dickinson)。另外,用偶联AF647的抗ICAM-1单抗对细胞染色,其后在FACS LSRII中分析。将骨髓机械性分离成单细胞悬液,而肾上腺、肾脏和脊髓细胞用机械分离和分散酶/胶原酶消化(Gibco,法国)的组合而制备。实验前,分散酶和胶原酶处理未显示出对MM细胞系上ICAM-1水平的影响。

[0282] 皮下建立的ARH-77体内模型

[0283] 将100μL5×10<sup>6</sup>ARH-77细胞皮下注射至雌性SCID小鼠的胁腹。肿瘤细胞注射后和整个实验中,3次/周测量肿瘤体积。当接近平均值为100mm<sup>3</sup>(第12天)时,根据肿瘤体积和所起始的治疗对小鼠随机分组。

[0284] 小鼠接受抗ICAM单抗,或者雷利米得<sup>®</sup>或万科<sup>®</sup>。

[0285] 对照小鼠接受对照单抗。

[0286] 整个实验中,以于200μL PBS溶液中2mg/kg的含量进行单克隆抗ICAM单抗或对照单抗的腹腔给药,2次/周。

[0287] 整个实验中,万科<sup>®</sup>(硼替佐米,3.5mg,Janssen-Cilag)如本发明所述制备,并在200μL中以0.5或1mg/kg腹腔注射,2次/周。

[0288] 整个实验中,雷利米得<sup>®</sup>(来那度胺,5mg/胶囊,Celgene)如本发明所述制备,并在200μL中以1或2mg/kg口服,5次/周。

[0289] 每天记录小鼠的健康状态和行为。如果它们显出恶液质、化合物毒性、后足瘫痪或严重体重减少的迹象,或者当肿瘤达到直径为1.5cm大小时,终止小鼠生命。

[0290] 结果

[0291] 抗ICAM-1抗体在播散性MM体内模型中较好的效果

[0292] BI-505和四种不同的标准治疗(SOC)治疗的播散性异种移植模型(多发性骨髓瘤细胞系RPMI-8226)与同种型对照治疗组相比显示出在BI-505治疗中大大改善的生存时间,见图13。另外,在非剧烈毒性的剂量下,抗ICAM-1单抗比其他SOC单一疗法更有效,见图13。

[0293] MM ICAM-1体内表达未受各种治疗影响

[0294] 当从所治疗的小鼠中分离肿瘤细胞时,从标准治疗(AIKERAN<sup>®</sup>, 雷利米得<sup>®</sup>, 地塞米松<sup>®</sup>或万科<sup>®</sup>)治疗的小鼠中收集的肿瘤细胞上ICAM-1仍然以未改变的高水平表达,见图14。

[0295] 实施例10:优选的药物制剂及给药模式和剂量

[0296] 可使用可注射的缓释给药系统递送本发明的抗体或抗原结合片段。这些经过专门设计以降低注射的频率。此类系统的实例是Nutropin Depot,其将重组人生长激素(rhGH)包封在可生物降解的微球中,其一经注射,即在较长的时期中缓慢地释放rhGH。

[0297] 可通过将药物直接释放到所需位点的手术植入装置施用本发明的抗体或抗原结合片段。例如,Vitrasert将更昔洛韦直接释放到眼中以治疗巨细胞病毒(CMV)视网膜炎。将此毒性剂直接应用到患病位点实现了有效的治疗,而没有药物的显著全身副作用。

[0298] 也可运用电穿孔治疗(EPT)系统进行给药。向细胞施加脉冲电场的装置提高了细胞膜对药物的渗透性,导致细胞内药物递送显著增强。

[0299] 还可通过电引入(electro-incorporation,EI)递送本发明的抗体或抗原结合片段。EI发生在皮肤表面上直径达30微米的小颗粒受到与用于电穿孔相同或类似的电脉冲的情况下。在EI中,这些颗粒被驱动穿过角质层,并进入皮肤的较深层。所述颗粒可负载或包被药物或基因,或可仅充当在皮肤中产生使药物能够由此进入的孔的“子弹”。

[0300] 用于给药的可选方法是热敏的ReGel<sup>®</sup>注射系统。低于体温时,ReGel是可注射的液体,而在体温下,其立即形成缓慢消蚀并溶解成已知安全的可生物降解聚合物的凝胶库。活性物质随着生物聚合物的溶解而随时间递送。

[0301] 本发明的抗体或其抗原结合片段可通过“特洛伊肽(Trojan peptide)”引入到细胞。这是被称作“穿透素(penetratin)”的一类多肽,其具有转位性质,并且能够携带亲水化合物跨过质膜。此系统可以引导抗体或抗原结合片段靶向细胞质和细胞核,并且具有非细胞类型特异性和高效性(Derossi et al.(1998),Trends Cell Biol8,84-87)。

[0302] 优选地,本发明的药物制剂是含有日剂量或单位、日亚剂量或其适合的小部分的活性组分的单位剂型。

[0303] 本发明的抗体或抗原结合片段可通过任何胃肠外途径施用,其可以是包含活性组分的药物制剂形式,任选地,所述活性组分是无毒的有机酸或无机酸、或有机碱或无机碱、或加成盐的形式。根据待治疗的疾病和患者,以及给药途径,所述组合物可以以不同剂量施用。

[0304] 在对人的治疗中,本发明的抗体或抗原结合片段可以单独施用,但通常与根据给药途径和标准制药实践而选择的合适药物赋形剂、稀释剂或载体混合施用。

[0305] 本发明的抗体或抗原结合片段还可以经胃肠外施用,例如经静脉内、动脉内、腹腔内、鞘内、心室内、胸骨内、颅内、肌肉内或皮下施用,或者可通过输注技术施用。其最好以无

菌水溶液的形式使用,所述无菌水溶液包含其他物质,例如,足以使所述溶液与血液等渗的盐或葡萄糖。如果必要,所述水溶液应经过适当缓冲(优选缓冲至pH3-9)。可通过本领域技术人员公知的标准制药技术容易地在无菌条件下制备适合的胃肠外制剂。

[0306] 适合胃肠外施用的制剂包括含水和无水的无菌注射溶液,其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂以及使所述制剂与目标受者血液等渗的溶质;还包括含水和无水的无菌悬浮液,其可包含悬浮剂和增稠剂。所述制剂可以存在于单位剂量或多剂量的容器中,例如密封的安瓿和小瓶,并且可在冷冻干燥(冻干)的条件下贮存,仅需要在临用前添加无菌液体载体,例如注射用水。即用型注射溶液和悬浮液可以由此前描述的各种无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0307] 通常,对于人,口服或胃肠外施用本发明的抗体是优选的途径,其最为便利。

[0308] 对于兽医使用,根据通常的兽医实践将本发明的抗体或抗原结合片段作为合适的可接受制剂来施用,兽医可确定对具体动物最合适的给药方案和施用途径。

[0309] 本发明药物组合物制剂可方便地以单位剂量形式呈递,并可通过药学领域公知的任何方法制备。这样的方法包括将活性组分与构成一个或多个附属组分的载体组合的步骤。通常,通过将活性组分与液体载体或细分的固体载体或这二者组合和之后如需要将产品成型来制备制剂。

[0310] 优选的单位剂量制剂是含有日剂量或单位、日亚剂量或其合适的小部分的活性组分的单位剂量制剂。

[0311] 本发明的优选递送系统可包括浸渍有本发明多肽、多核苷酸和抗体的水凝胶,优选在棉塞上实施,所述棉塞能被插入宫颈,且一旦产生适当的宫颈成熟或其他在女性生殖系统上的所需效果后,可被撤出。

[0312] 应知道,除了以上提及的具体组分,本发明制剂可包含本领域常规的所述制剂类型相关的其他试剂。

[0313] 实施例11:示例性药物制剂

[0314] 尽管可以单独进行本发明抗体的给药,但优选将其作为药物制剂与一种或多种可接受的载体一起提供。载体必须是“可接受的”,表示其与本发明化合物相容且对受者无害。通常,载体为无菌且无致热原的水或盐水。

[0315] 以下实施例说明了本发明的药物制剂,其中活性组分为本发明的化合物。

[0316] 实施例11A:注射制剂

[0317] 活性组分 0.200g

[0318] 加无菌无致热原磷酸盐缓冲液(pH7.0)至10ml

[0319] 将活性组分溶解在大部分磷酸盐缓冲液(35-40℃)中,随后补足体积并通过无菌微孔滤器过滤至无菌10ml琥珀色玻璃瓶中(1类),并用无菌封闭物(closure)和瓶盖(overseal)密封。

[0320] 实施例11B:肌肉注射剂

|        |                            |         |
|--------|----------------------------|---------|
| [0321] | 活性组分                       | 0.20g   |
|        | 苯甲醇                        | 0.10 g  |
|        | Glucofurol 75 <sup>®</sup> | 1.45 g  |
|        | 加足量(q.s.)注射用水至             | 3.00 ml |

[0322] 将活性组分溶解在糖原质(glycofurol)中。随后加入苯甲醇并溶解,加水至3ml。随后将混合物通过无菌微孔滤器过滤,并随后密封在无菌3ml玻璃瓶(1类)中。

[0323] 实施例11C:片剂

|        |         |        |
|--------|---------|--------|
| [0324] | 活性组分    | 100 mg |
|        | 乳糖      | 200 mg |
|        | 淀粉      | 50 mg  |
|        | 聚乙烯吡咯烷酮 | 5 mg   |
|        | 硬脂酸镁    | 4 mg   |
|        |         | 359 mg |

[0325] 通过湿法制粒随后压缩由前述组分制备片剂。

[0326] 编号的参考文献:

[0327] 1.Weiner,L.M.,Surana,R.,and Wang,S.Monoclonal antibodies:versatile platforms for cancer immunotherapy.Nat Rev Immunol10:317-327.

[0328] 2.McLaughlin,P.,Grillo-Lopez,A.J.,Link,B.K.,Levy,R.,Czuczman,M.S.,Williams,M.E.,Heyman,M.R.,Bence-Bruckler,I.,White,C.A.,Cabanillas,F.,et al.1998.Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma:half of patients respond to a four-dose treatment program.J Clin Oncol16:2825-2833.

[0329] 3.Davis,T.A.,White,C.A.,Grillo-Lopez,A.J.,Velasquez,W.S.,Link,B.,Maloney,D.G.,Dillman,R.O.,Williams,M.E.,Mohrbacher,A.,Weaver,R.,et al.1999.Single-agent monoclonal antibody efficacy in bulky non-Hodgkin's lymphoma:results of a phase II trial of rituximab.J Clin Oncol17:1851-1857.

[0330] 4.Hiddemann,W.,Kneba,M.,Dreyling,M.,Schmitz,N.,Lengfelder,E.,Schmits,R.,Reiser,M.,Metzner,B.,Harder,H.,Hegewisch-Becker,S.,et al.2005.Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin,vincristine,and prednisone(CHOP)significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone:results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group.Blood 106:3725-3732.

[0331] 5.Herold,M.,Haas,A.,Srock,S.,Neser,S.,Al-Ali,K.H.,Neubauer,A.,Dolken,G.,Naumann,R.,Knauf,W.,Freund,M.,et al.2007.rituximab added to first-line mitoxantrone,chlorambucil,and prednisolone chemotherapy followed by

interferon maintenance prolongs survival in patients with advanced follicular lymphoma:an East German Study Group Hematology and Oncology Study.J Clin Oncol25:1986-1992.

[0332] 6.Marcus,R.,Imrie,K.,Solal-Celigny,P.,Catalano,J.V.,Dmoszynska,A.,Raposo,J.C.,Offner,F.C.,Gomez-Codina,J.,Belch,A.,Cunningham,D.,et al.2008.Phase III study of R-CVP compared with cyclophosphamide,vincristine, and prednisone alone in patients with previously untreated advanced follicular lymphoma.J Clin Oncol26:4579-4586.

[0333] 7.Coiffier,B.2007.Rituximab therapy in malignant lymphoma.Oncogene26:3603-3613.

[0334] 8.Cheson,B.D.,and Leonard,J.P.2008.Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma.N Engl J Med359:613-626.

[0335] 9.Smith,M.R.2003.Rituximab(monoclonal anti-CD20antibody):mechanisms of action and resistance.Oncogene22:7359-7368.

[0336] 10.Fransson,J.,Tornberg,U.C.,Borrebaeck,C.A.,Carlsson,R.,and Frendeus,B.2006.Rapid induction of apoptosis in B-cell lymphoma by functionally isolated human antibodies.Int J Cancer119:349-358.

[0337] 11.Horst,E.,Radaszkiewicz,T.,Hooftman-den Otter,A.,Pieters,R.,van Dongen,J.J.,Meijer,C.J.,and Pals,ST.1991.Expression of the leucocyte integrin LFA-1(CD11a/CD18)and its ligand ICAM-1(CD54)in lymphoid malignancies is related to lineage derivation and stage of differentiation but not to tumor grade.Leukemia5:848-853.

[0338] 12.Hideshima,T.,Mitsiades,C,Tonon,G.,Richardson,P.G.,and Anderson,K.C.2007.Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets.Nat Rev Cancer7:585-598.

[0339] 13.Huang,Y.W.,Richardson,J.A.,and Vitetta,E.S.1995.Anti-CD54(ICAM-1) has antitumor activity in SCID mice with human myeloma cells.Cancer Res55:610-616.

[0340] 14.Schmidmaier,R.,Morsdorf,K.,Baumann,P.,Emmerich,B.,and Meinhardt,G.2006.Evidence for cell adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma cells in vivo.Int J Biol Markers21:218-222.

[0341] 15.Johnson,J.P.,Stade,B.G.,Hupke,U.,Holzmann,B.,and Riethmuller,G.1988.The melanoma progression-associated antigen P3.58 is identical to the intercellular adhesion molecule,ICAM-1.Immunobiology178:275-284.

[0342] 16.Johnson,J.P.,Lehmann,J.M.,Stade,B.G.,Rothbacher,U.,Sers,C,and Riethmuller,G.1989.Functional aspects of three molecules associated with metastasis development in human malignant melanoma.Invasion Metastasis9:338-350.

[0343] 17.Grothey,A.,Heistermann,P.,Philippou,S.,and Voigtman,R.1998.Serum

levels of soluble intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1,CD54)in patients with non-small-cell lung cancer:correlation with histological expression of ICAM-1 and tumour stage.Br J Cancer77:801-807.

[0344] 18.Maruo,Y.,Gochi,A.,Kaiharu,A.,Shimamura,H.,Yamada,T.,Tanaka,N.,and Orita,K.2002.ICAM-1 expression and the soluble ICAM-1level for evaluating the metastatic potential of gastric cancer.Int J Cancer 100:486-490.

[0345] 19.Roche,Y.,Pasquier,D.,Rambeaud,J.J.,Seigneurin,D.,and Duperray,A.2003.Fibrinogen mediates bladder cancer cell migration in an ICAM-1-dependent pathway.Thromb Haemost89:1089-1097.

[0346] 20.Rosette,C,Roth,R.B.,Oeth,P.,Braun,A.,Kammerer,S.,Ekblom,J.,and Denissenko,M.F.2005.Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells.Carcinogenesis26:943-950.

[0347] 21.Aalinkeel,R.,Nair,.P.N.,Sufrin,G.,Mahajan,S.D.,Chadha,K.C.,Chawda,R.P.,and Schwartz,S.A.2004.Gene Expression of Angiogenic Factors Correlates with Metastatic Potential of Prostate Cancer Cells.Cancer Res64:5311-5321.

[0348] 22.Migkou,M.,Terpos,E.,Christoulas,M.,Gavriatopoulou,M.,Boutsikas,M.,Gkotsamanidou,M.,Iakovaki,M.,Kastritis,M.,Papatheodorou,M.,and Dimopoulos,M.A.2009.Increased levels of Vascular Cell Adhesion Molecule-1(VCAM-1)and Inter-Cellular Adhesion Molecule-1(ICAM-1)Correlate with Advanced Disease Features and Poor Survival in Newly Diagnosed Patients with Multiple Myeloma.Reduction Post-Bortezomib-and Lenalidomide-Based Regimens In 51st ASH annual meeting and exposition.New Orleans,LA.

[0349] 23.Kapoor,P.,Greipp,P.T.,Morice,W.G.,Rajkumar,S.V.,Witzig,T.E.,and Greipp,P.R.2008.Anti-CD20 monoclonal antibody therapy in multiple myeloma.Br J Haematol141:135-148.

[0350] 24.Tai,Y.-T.,Catley,L.P.,Mitsiades,C.S.,Burger,R.,Podar,K.,Shringpaure,R.,Hideshima,T.,Chauhan,D.,Hamasaki,M.,Ishitsuka,K.,et al.2004.Mechanisms by which SGN-40,a Humanized Anti-CD40 Antibody,Induces Cytotoxicity in Human Multiple Myeloma Cells:Clinical Implications.Cancer Res64:2846-2852.

[0351] 25.Treon,S.P.,Pilarski,L.M.,Belch,A.R.,Kelliher,A.,Preffer,F.I.,Shima,Y.,Mitsiades,C.S.,Mitsiades,N.S.,Szczepek,A.J.,Ellman,L,et al.2002.CD20-directed serotherapy in patients with multiple myeloma:biologic considerations and therapeutic applications.J Immunother25:72-81.

[0352] 26.Mitsiades,C.S.,Treon,S.P.,Mitsiades,N.,Shima,Y.,Richardson,P.,Schlossman,R.,Hideshima,T.,and Anderson,K.C.2001.TRAIUAp2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma:therapeutic applications.Blood98:795-804.

[0353] 27.Treon,S.P.,Mitsiades,C,Mitsiades,N.,Young,G.,Doss,D.,Schlossman,

R., and Anderson, K.C. 2001. Tumor Cell Expression of CD59 Is Associated With Resistance to CD20 Serotherapy in Patients With B-Cell Malignancies. *J Immunother* 24:263-271.

[0354] 28. Ralph, P. 1985. The human B-cell lineage cell line ARH-77. *Cancer* 56: 2544-2545.

[0355] 29. Huang, Y.W., Richardson, J.A., Tong, A.W., Zhang, B.Q., Stone, M.J., and Vitetta, E.S. 1993. Disseminated growth of a human multiple myeloma cell line in mice with severe combined immunodeficiency disease. *Cancer Res* 53:1392-1396.

[0356] 30. Tong, A.W., Huang, Y.W., Zhang, B.Q., Netto, G., Vitetta, E.S., and Stone, M.J. 1993. Heterotransplantation of human multiple myeloma cell lines in severe combined immunodeficiency (SCID) mice. *Anticancer Res* 13:593-597.

[0357] 31. Lokhorst, H.M., Lamme, T., de Smet, M., Klein, S., de Weger, R.A., van Oers, R., and Bloem, A.C. 1994. Primary tumor cells of myeloma patients induce interleukin-6 secretion in long-term bone marrow cultures. *Blood* 84:2269-2277.

[0358] 32. Tong, A.W., Zhang, B.Q., Mues, G., Solano, M., Hanson, T., and Stone, M.J. 1994. Anti-CD40 antibody binding modulates human multiple myeloma clonogenicity in vitro. *Blood* 84:3026-3033.

[0359] 33. Alsina, M., Boyce, B.F., Mundy, G.R., and Roodman, G.D. 1995. An in vivo model of human multiple myeloma bone disease. *Stem Cells* 13 Suppl 2:48-50.

[0360] 34. Bellamy, W.T., Mendibles, P., Bontje, P., Thompson, F., Richter, L., Weinstein, R.S., and Grogan, T.M. 1996. Development of an orthotopic SCID mouse-human tumor xenograft model displaying the multidrug-resistant phenotype. *Cancer Chemother Pharmacol* 37:305-316.

[0361] 35. Chauhan, D., Uchiyama, H., Akbarali, Y., Urashima, M., Yamamoto, K., Libermann, T.A., and Anderson, K.C. 1996. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood* 87:1104-112.

[0362] 36. Urashima, M., Chen, B.P., Chen, S., Pinkus, G.S., Bronson, R.T., Deder, D.A., Hoshi, Y., Teoh, G., Ogata, A., Treon, S.P., et al. 1997. The development of a model for the homing of multiple myeloma cells to human bone marrow. *Blood* 90: 754-765.

[0363] 37. Kobune, M., Chiba, H., Kato, J., Kato, K., Nakamura, K., Kawano, Y., Takada, K., Takimoto, R., Takayama, T., Hamada, H., et al. 2007. Wnt3/RhoA/ROCK signaling pathway is involved in adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma in an autocrine mechanism. *Mol Cancer Ther* 6:1774-1784.

[0364] 38. Nadav, L., Katz, B.Z., Baron, S., Cohen, N., Naparstek, E., and Geiger, B. 2006. The generation and regulation of functional diversity of malignant plasma cells. *Cancer Res* 66:8608-8616.

[0365] 39. Kawai, S., Yoshimura, Y., Iida, S., Kinoshita, Y., Koishihara, Y., Ozaki, S.,

Matsumoto,T.,Kosaka,M.,and Yamada-Okabe,H.2006.Antitumor activity of humanized monoclonal antibody against HM1.24 antigenin human myeloma xenograft models.Oncol Rep15:361-367.

[0366] 40.Ural,A.U.,Yilmaz,M.I.,Avcu,F.,Pekel,A.,Zerman,M.,Nevruz,O.,Sengul,A.,and Yalcin,A.2003.The bisphosphonate zoledronic acid induces cytotoxicity in human myeloma cell lines with enhancing effects of地塞米松and thalidomide.Int J Hematol78:443-449.

[0367] 41.Drucker,L,Uziel,O.,Tohami,T.,Shapiro,H.,Radnay,J.,Yarkoni,S.,Lahav,M.,and Lishner,M.2003.Thalidomide down-regulates transcript levels of GC-rich promoter genes in multiple myeloma.Mol Pharmacol64:415-420.

[0368] 42.Choi,S.J.,Oba,T.,Callander,N.S.,Jelinek,D.F.,and Roodman,G.D.2003.AML-1A and AML-1B regulation of MIP-1 alpha expression in multiple myeloma.Blood101:3778-3783.

[0369] 43.Tian,J.Y.,Hu,W.X.,Tian,E.M.,Shi,Y.W.,Shen,Q.X.,Tang,L.J.,and Jiang,Y.S.2003.Cloning and sequence analysis of tumor-associated gene hMMTAG2 from human multiple myeloma cell line ARH-77.Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao(Shanghai)35:143-148.

[0370] 44.Tong,A.W.,Seamour,B.,Chen,J.,Su,D.,Ordenez,G.,Frase,L,Netto,G.,and Stone,M.J.2000.CD40 ligand-induced apoptosis is Fas-independent in human multiple myeloma cells.Leuk Lymphoma36:543-558.

[0371] 45.Feinman,R.,Koury,J.,Thames,M.,Barlogie,B.,Epstein,J.,and Siegel,D.S.1999.Role of NF-kappaB in the rescue of multiple myeloma cells from glucocorticoid-induced apoptosis by bcl-2.Blood93:3044-3052.

[0372] 46.Thomas,X.,Anglaret,B.,Magaud,J.P.,Epstein,J.,and Archimbaud,E.1998.Interdependence between cytokines and cell adhesion molecules to induce interleukin-6 production by stromal cells in myeloma.Leuk Lymphoma 32: 107-119.

[0373] 47.Roodman,G.D.1997.Mechanisms of bone lesions in multiple myeloma and lymphoma.Cancer80:1557-1563.

[0374] 48.Ozaki,S.,Kosaka,M.,Wakatsuki,S.,Abe,M.,Koishihara,Y.,and Matsumoto,T.1997.Immunotherapy of multiple myeloma with a monoclonal antibody directed against a plasma cell-specific antigen,HM1.24.Blood90:3179-3186.

[0375] 49.Lopes de Menezes,D.E.,Denis-Mize,K.,Tang,Y.,Ye,H.,Kunich,J.C.,Garrett,E.N.,Peng,J.,Cousens,L.S.,Gelb,A.B.,Heise,C,et al.2007.Recombinant interleukin-2 significantly augments activity of rituximab in human tumor xenograft models of B-cell non-Hodgkin lymphoma.J Immunother(1997)30:64-74.

[0376] 50.de Bont,E.S.,Guikema,J.E.,Scherpen,F.,Meeuwssen,T.,Kamps,W.A.,Vellenga,E.,and Bos,N.A.2001.Mobilized human CD34+hematopoietic stem cells enhance tumor growth in a nonobese diabetic/severe combined immunodeficient



mouse model of human non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 61:7654-7659.

[0377] 51. Sampaio, M.S., Vettore, A.L., Yamamoto, M., Chauffaille Mde, L., Zago, M.A., and Colleoni, G.W. 2009. Expression of eight genes of nuclear factor-kappa B pathway in multiple myeloma using bone marrow aspirates obtained at diagnosis. *Histol Histopathol* 24:991-997.

[0378] 52. Weng, W.K., and Levy, R. 2003. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 21:3940-3947.

[0379] 53. Musolino, A., Naldi, N., Bortesi, B., Pezzuolo, D., Capelletti, M., Missale, G., Laccabue, D., Zerbini, A., Camisa, R., Bisagni, G., et al. 2008. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 26:1789-1796.

[0380] 54. Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., and Ravetch, J.V. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6:443-446.

[0381] 55. Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D.A., Fernandez, N., Jorieux, S., and Daeron, M. 2009. Specificity and affinity of human Fc gamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113:3716-3725.

[0382] 56. Carter, P.J. 2006. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 6:343-357.

[0383] 57. Cragg, M.S., Morgan, S.M., Chan, H.T., Morgan, B.P., Filatov, A.V., Johnson, P.W., French, R.R., and Glennie, M.J. 2003. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood* 101:1045-1052.

[0384] 58. Manches, O., Lui, G., Chaperot, L., Gressin, R., Molens, J.P., Jacob, M.C., Sotto, J.J., Leroux, D., Bensa, J.C., and Plumas, J. 2003. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 101:949-954.

[0385] 59. Cragg, M.S., and Glennie, M.J. 2004. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood* 103:2738-2743.

[0386] 60. Smith, M.E., and Thomas, J.A. 1990. Cellular expression of lymphocyte function associated antigens and the intercellular adhesion molecule-1 in normal tissue. *J Clin Pathol* 43:893-900.

[0387] 61. Roebuck, K.A., and Finnegan, A. 1999. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol* 66:876-888.

[0388] 62. Stebbings, R., Findlay, L., Edwards, C., Eastwood, D., Bird, C., North, D., Mistry, Y., Dilger, P., Liefoghe, E., Cludts, I., et al. 2007. "Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. *J Immunol* 179:3325-3331.

- [0389] 63.Davis,T.A.,Grillo-Lopez,A.J.,White,C.A.,McLaughlin,P.,Czuczman,M.S.,Link,B.K.,Maloney,D.G.,Weaver,R.L.,Rosenberg,J.,and Levy,R.2000.rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma:safety and efficacy of re-treatment.J Clin Oncol 18:3135-3143.
- [0390] 64.Kyle,R.A.,and Rajkumar,S.V.2004.Multiple myeloma.N Engl J Med351:1860-1873
- [0391] 65.Zhang,W.,Gordon,M.,Schultheis,A.M.,Yang,D.Y.,Nagashima,F.,Azuma,M.,Chang,H.M.,Borucka,E.,Lurje,G.,Sherrod,A.E.,et al.2007.FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab.J Clin Oncol25:3712-3718.
- [0392] 66.Lejeune,J.,Thibault,G.,Ternant,D.,Cartron,G.,Watier,H.,and Ohresser,M.2008.Evidence for linkage disequilibrium between Fcgamma R11a-V158F and Fcgamma R11a-H131R polymorphisms in white patients,and for an Fcgamma R11a-restricted influence on the response to therapeutic antibodies.J Clin Oncol26:5489-5491;author reply5491-5482.
- [0393] 67.Bibeau,F.,Lopez-Crapez,E.,Di Fiore,F.,Thezenas,S.,Ychou,M.,Blanchard,F.,Lamy,A.,Penault-Llorca,F.,Frebourg,T.,Michel,P.,et al.2009.Impact of Fc{gamma}R11a-Fc{gamma}R11a polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan.J Clin Oncol27:1122-1129.
- [0394] 68.Schmidmaier,R.,Baumann,P.,Simsek,M.,Dayyani,F.,Emmerich,B.,and Meinhardt,G.2004.The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin overcomes cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma by geranylgeranylation of Rho protein and activation of Rho kinase.Blood104:1825-1832.
- [0395] 69.Urashima,M.,Chauhan,D.,Hatziyanni,M.,Ogata,A.,Hollenbaugh,D.,ruffo,A.,and Anderson,K.C.1996.CD40 ligand triggers interleukin-6mediated B cell differentiation.Leuk Res20:507-515.
- [0396] 70.Yaccoby,S.,Barlogie,B.,and Epstein,J.1998.Primary myeloma cells growing in SCID-hu mice:a model for studying the biology and treatment of myeloma and its manifestations.Blood92:2908-2913.
- [0397] 71.Yaccoby,S.,Wezeman,M.J.,Henderson,A.,Cottier-Fox,M.,Yi,Q.,Barlogie,B.,and Epstein,J.2004.Cancer and the microenvironment:myeloma-osteoclast interactions as a model.Cancer Res64:2016-2023.
- [0398] 72.Mitsiades,N.,Mitsiades,C.S.,Poulaki,V.,Chauhan,D.,Richardson,P.G.,Hideshima,T.,Munshi,N.C.,Treon,S.P.,and Anderson,K.C.2002.Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells:therapeutic implications.Blood99:4525-4530.
- [0399] 73.Chauhan,D.,Pandey,P.,Hideshima,T.,Treon,S.,Raje,N.,Davies,F.E.,

Shima,Y.,Tai,Y.T.,Rosen,S.,Avraham,S.,et al.2000.SHP2 mediates the protective effect of interleukin-6 against dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells.J Biol Chem275:27845-27850.

[0400] 74.Hideshima,T.,Chauhan,D.,Shima,Y.,Raje,N.,Davies,F.E.,Tai,Y.T.,reon,S.P.,Lin,B.,Schlossman,R.L.,Richardson,P.,et al.2000.Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiplemyeloma cells to conventional therapy.Blood96:2943-2950.

[0401] 75.Schneider,D.,Berrouschot,J.,Brandt,T.,Hacke,W.,Ferber,A.,Norris,H.,Polmar,S.H.,and Schafer,E.1998.Safety,pharmacokinetics and biological activity of enlimomab(anti-ICAM-1 antibody):an open-label,dose escalation study in patients hospitalized for acute stroke.Eur Neurol40:78-83.

[0402] 76.Salmela,K.,Wramner,L,Ekberg,H.,Hauser,I.,Bentdal,O.,Lins,L.E.,Isoniemi,H.,Backman,L,Persson,N.,Neumayer,H.H.,et al.1999.A randomized multicenter trial of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody (enlimomab)for the prevention of acute rejection and delayed onset of graftfunction in cadaveric renal transplantation:a report of the European Anti-ICAM-1 Renal Transplant Study Group.Transplantation67:729-736.

[0403] 77.Mileski,W.J.,Burkhart,D.,Hunt,J.L,Kagan,R.J.,Saffle,J.R.,Herndon,N.,Heimbach,D.M.,Luterman,A.,Yurt,R.W.,Goodwin,C.W.,et al.2003.Clinical effects of inhibiting leukocyte adhesion with monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1(enlimomab)in the treatment of partial-thickness burn injury.J Trauma54:950-958.

[0404] 78.Kavanaugh,A.F.,Davis,L.S.,Nichols,L.A.,Norris,S.H.,Rothlein,R.,charschmidt,L.A.,and Lipsky,P.E.1994.Treatment of refractory rheumatoid arthritis with a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule1.Arthritis Rheum37:992-999

[0405] 79.Kavanaugh,A.F.,Davis,L.S.,Jain,R.I.,Nichols,L.A.,Norris,S.H.,and Lipsky,P.E.1996.A phase I/II open label study of the safety and efficacy of an anti-ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1;CD54)monoclonal antibody in early rheumatoid arthritis.J Rheumatol23:1338-1344.

[0406] 80.Kavanaugh,A.F.,Schulze-Koops,H.,Davis,L.S.,and Lipsky,P.E.1997.Repeat treatment of rheumatoid arthritis patients with a murine anti-intercellular adhesion molecule 1 monoclonal antibody.Arthritis Rheum40:849-853

## 序列表

|        |                                                                 |                            |
|--------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------|
|        | <110>                                                           | 生物发明国际公司                   |
|        | <120>                                                           | 抗ICAM-1抗体在治疗患有复发性癌症的患者中的用途 |
|        | <130>                                                           | BI0BH/P49295PC             |
|        | <140>                                                           | PCT/EP2011/061983          |
|        | <141>                                                           | 13/07/2011                 |
|        | <150>                                                           | GB1011771.1                |
|        | <151>                                                           | 13/07/2010                 |
|        | <160>                                                           | 10                         |
|        | <170>                                                           | SeqWin99                   |
|        | <210>                                                           | 1                          |
|        | <211>                                                           | 14                         |
|        | <212>                                                           | PRT                        |
|        | <213>                                                           | 人工序列                       |
|        | <220>                                                           |                            |
|        | <223>                                                           | CDR                        |
| [0001] | <400>                                                           | 1                          |
|        | Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly         | 10                         |
|        | 1 5                                                             |                            |
|        | <210>                                                           | 2                          |
|        | <211>                                                           | 19                         |
|        | <212>                                                           | PRT                        |
|        | <213>                                                           | 人工序列                       |
|        | <220>                                                           |                            |
|        | <223>                                                           | CDR                        |
|        | <400>                                                           | 2                          |
|        | Ala Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val | 15                         |
|        | 1 5 10                                                          |                            |
|        | Lys Gly Arg                                                     |                            |
|        | <210>                                                           | 3                          |
|        | <211>                                                           | 10                         |
|        | <212>                                                           | PRT                        |
|        | <213>                                                           | 人工序列                       |
|        | <220>                                                           |                            |
|        | <223>                                                           | CDR                        |
|        | <400>                                                           | 3                          |
|        | Ala Arg Tyr Ser Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr                         | 10                         |
|        | 1 5                                                             |                            |

|        |                                                                   |          |  |
|--------|-------------------------------------------------------------------|----------|--|
| [0002] | <210>                                                             | 4        |  |
|        | <211>                                                             | 15       |  |
|        | <212>                                                             | PRT      |  |
|        | <213>                                                             | 人工序列     |  |
|        | <220>                                                             |          |  |
|        | <223>                                                             | CDR      |  |
|        | <400>                                                             | 4        |  |
|        | Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His       |          |  |
|        | 1 5 10 15                                                         |          |  |
|        | <210>                                                             | 5        |  |
|        | <211>                                                             | 7        |  |
|        | <212>                                                             | PRT      |  |
|        | <213>                                                             | 人工序列     |  |
|        | <220>                                                             |          |  |
|        | <223>                                                             | CDR      |  |
|        | <400>                                                             | 5        |  |
|        | Asp Asn Asn Asn Arg Pro Ser                                       |          |  |
|        | 1 5                                                               |          |  |
|        | <210>                                                             | 6        |  |
|        | <211>                                                             | 12       |  |
|        | <212>                                                             | PRT      |  |
|        | <213>                                                             | 人工序列     |  |
|        | <220>                                                             |          |  |
|        | <223>                                                             | CDR      |  |
|        | <400>                                                             | 6        |  |
|        | Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Ala Trp Leu                   |          |  |
|        | 1 5 10                                                            |          |  |
|        | <210>                                                             | 7        |  |
|        | <211>                                                             | 351      |  |
|        | <212>                                                             | DNA      |  |
|        | <213>                                                             | 人工序列     |  |
|        | <220>                                                             |          |  |
|        | <223>                                                             | B11重链可变区 |  |
|        | <400>                                                             | 7        |  |
|        | gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagge ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc  | 60       |  |
|        | tcctgtgcag cctctggatt caccctcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct | 120      |  |
|        | ccagggaagg ggctggagtg ggtggcattt atatggtatg atggaagtaa taaatactat | 180      |  |
|        | gcagactcgg tgaagggecg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat | 240      |  |
|        | ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac actgccgtgt attactgtgc gagatacagt | 300      |  |
|        | ggctgggtact ttgactactg gggecaaggt acactggtea cctgagctc a          | 351      |  |
|        | <210>                                                             | 8        |  |
|        | <211>                                                             | 117      |  |
|        | <212>                                                             | PRT      |  |
|        | <213>                                                             | 人工序列     |  |

```

<220>
<223>   B11重链可变区

<400>   8
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20          25          30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Ala Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Arg Tyr Ser Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100         105         110
Val Thr Val Ser Ser
115

[0003] <210>   9
<211>   336
<212>   DNA
<213>   人工序列

<220>
<223>   B11轻链可变区

<400>   9
cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tetgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
tctgcactg ggagcagctc caacatcggt gcaggttatg atgtacactg gttcagcag 120
ctcccaggaa cgcccccaa actctctate tatgataaca acaatcggtc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tcttggtc caagctctgc acctcagcct ccttgccat cagtgggtc 240
cggtcggagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct cagtgttgg 300
ctgttcggcg gaggaaccaa gctgacggtc ctaggt 336

<210>   10
<211>   112
<212>   PRT
<213>   人工序列

<220>
<223>   B11轻链可变区

<400>   10
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1          5          10          15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly

```

|        | 20                                                                             | 25 | 30 |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------|----|----|
|        | Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu<br>35 40 45    |    |    |
|        | Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe<br>50 55 60    |    |    |
| [0004] | Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu<br>65 70 75 80 |    |    |
|        | Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser<br>85 90 95    |    |    |
|        | Leu Ser Ala Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly<br>100 105 110 |    |    |

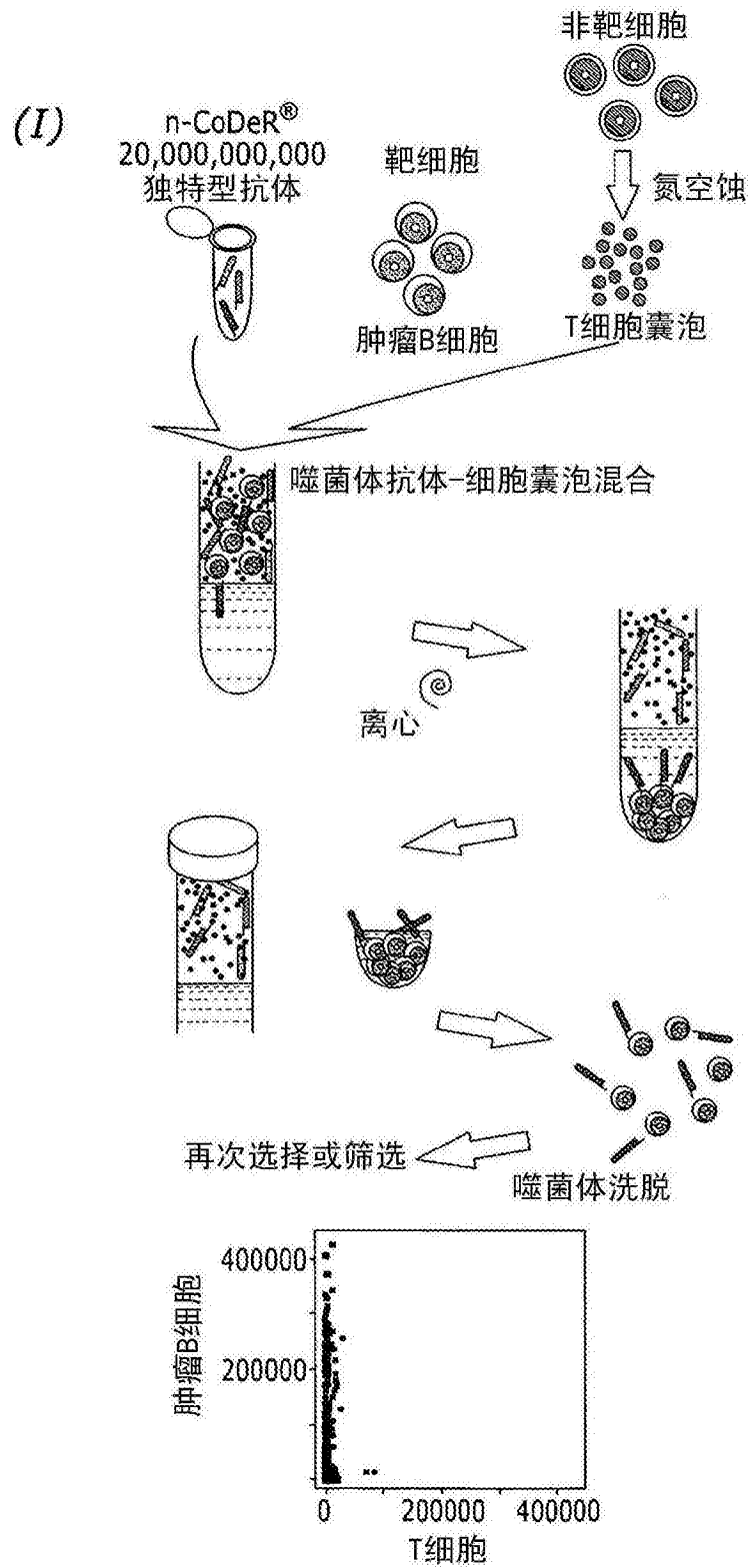


图1



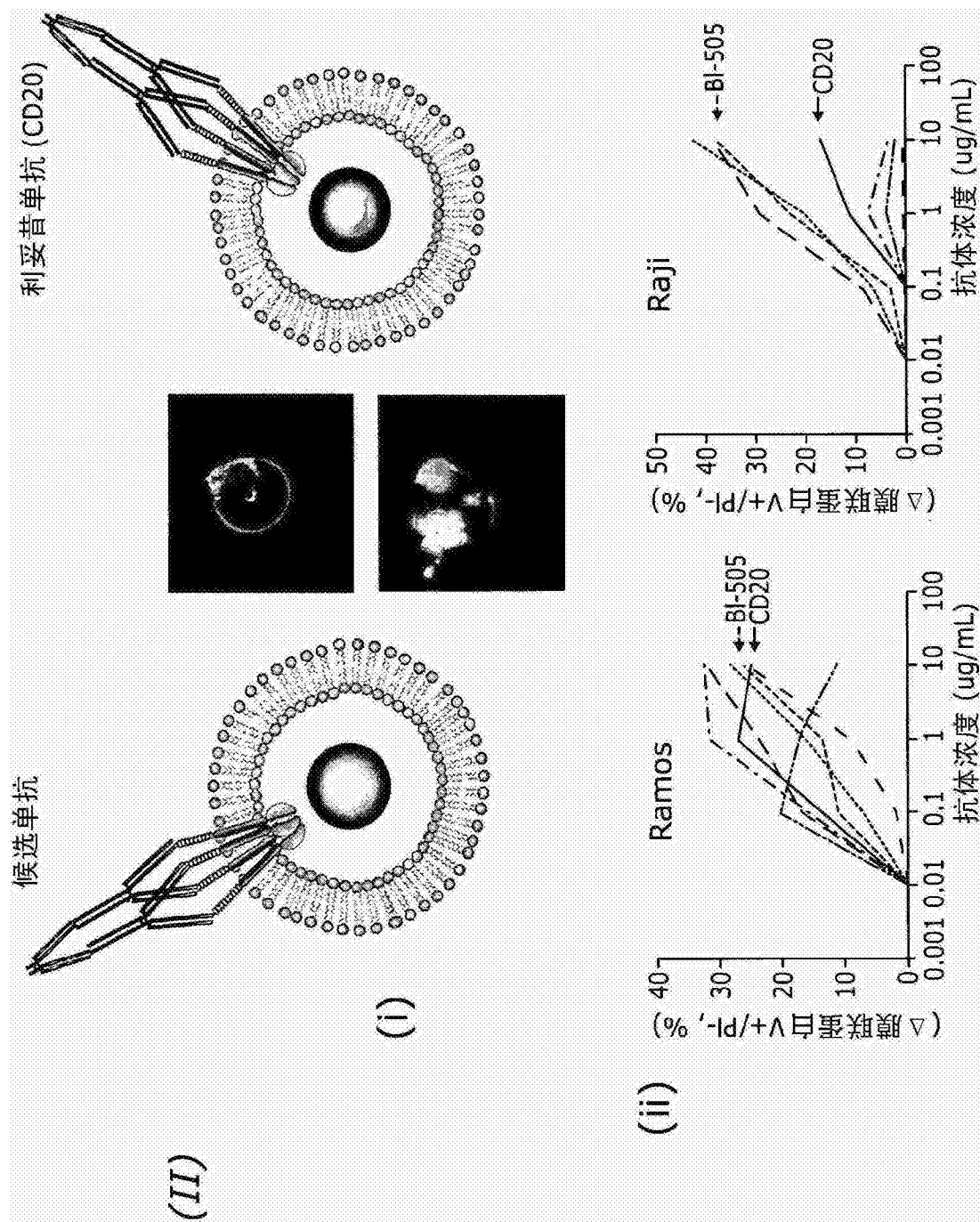


图1(续)

(III)

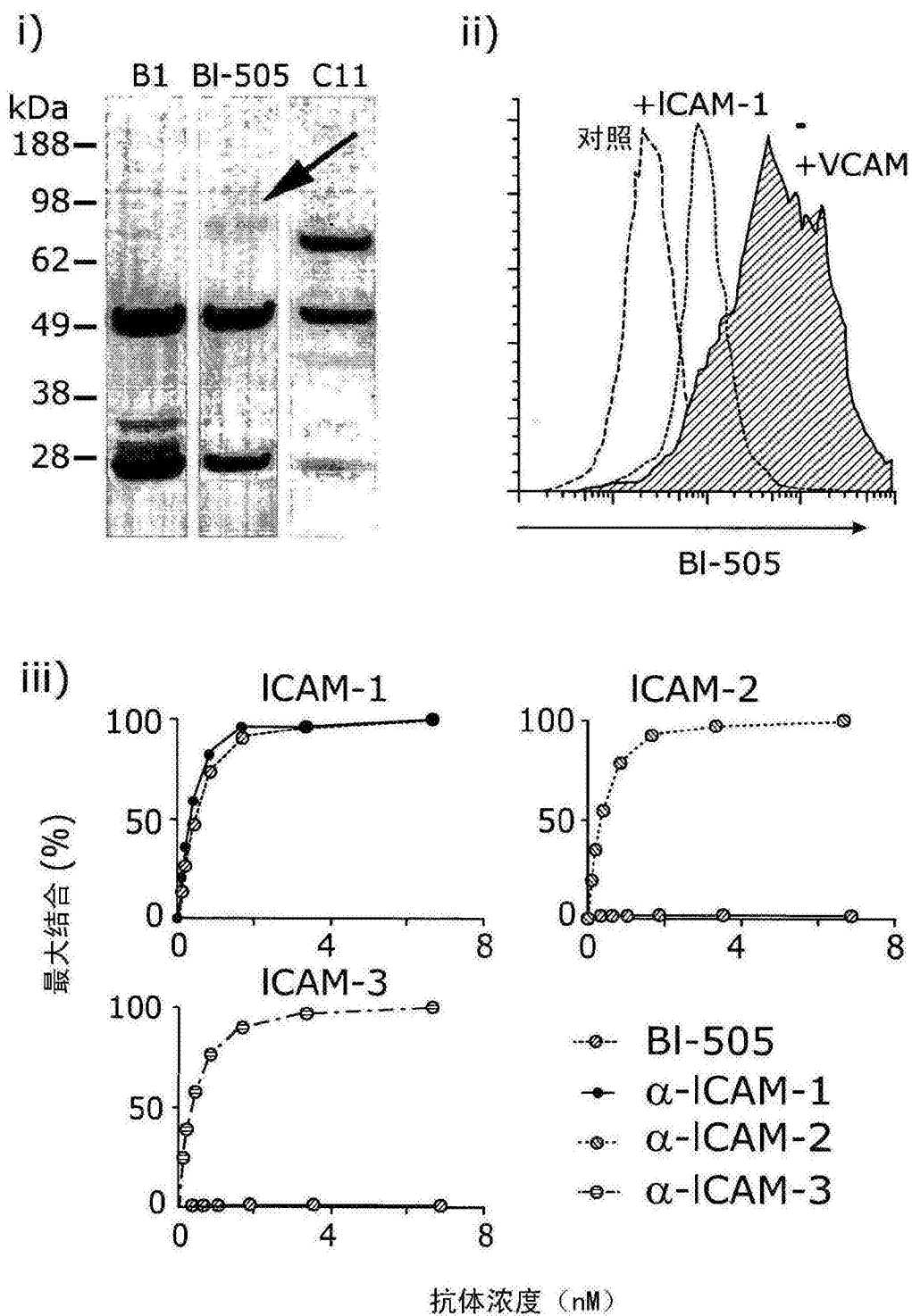


图1(续)

(IV)



图1(续)

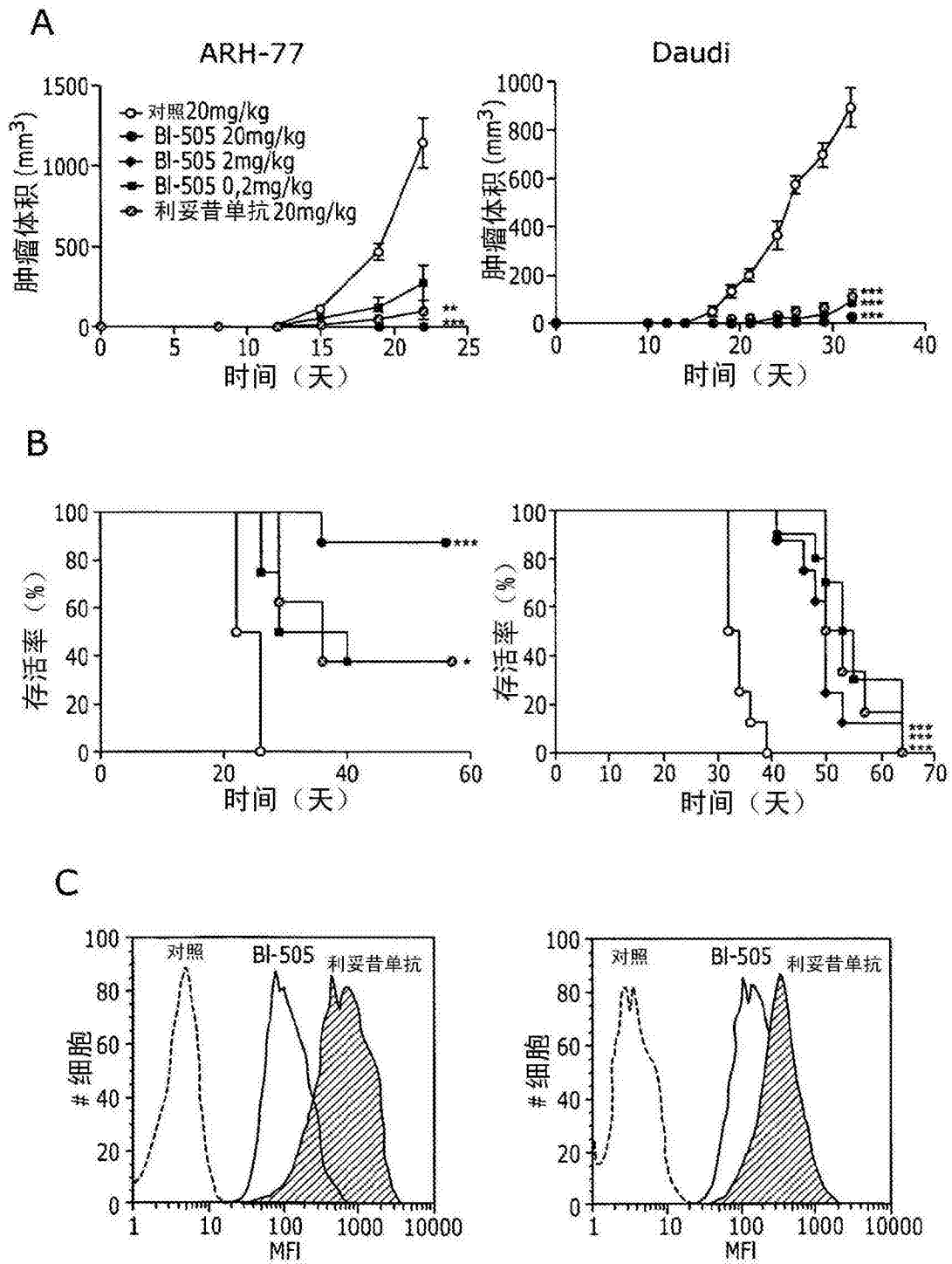


图2

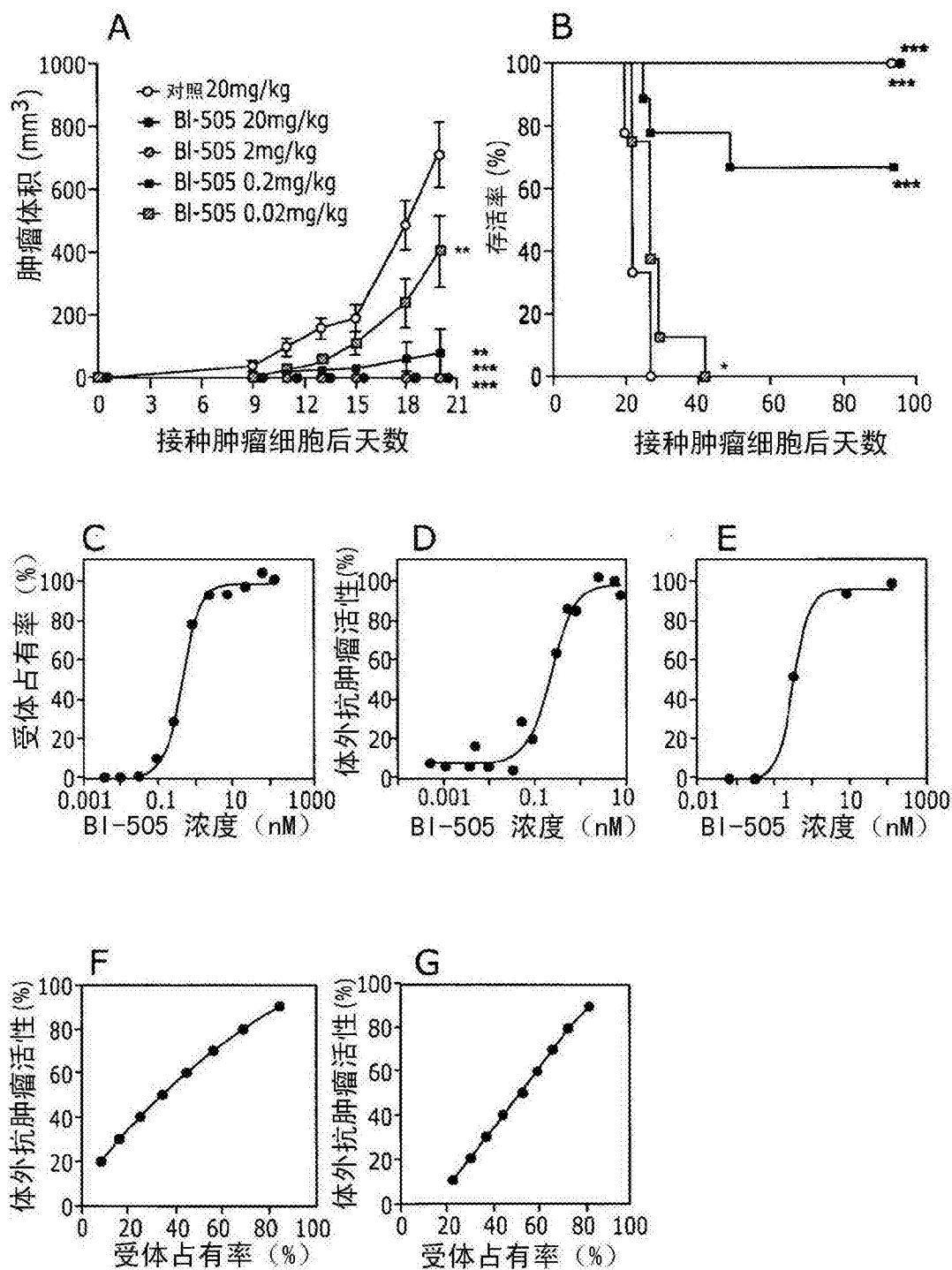


图3

| 编号  | 年龄 | 性别 | Ig | M (g/L) | 骨骼<br>破坏 | 浆细胞<br>形态 | (%)<br>FACS | BI-505 | ISS | T | 诊断      |
|-----|----|----|----|---------|----------|-----------|-------------|--------|-----|---|---------|
| #1  | 38 | M  | G  | 10      | 0        | 14        | 2           | +++    | I   | 0 | MM      |
| #2  | 46 | M  | G  | 38      | 0        | 34        | 20          | +++    | II  | 0 | MM      |
| #3  | 53 | F  | G  | 14      | >10      | 6         | 22          | +++/** | I   | 0 | MM      |
| #4  | 54 | M  | -  | 0       | 3        | 22        | 5           | +++    | III | 2 | 非分泌性MM  |
| #5  | 59 | M  | G  | 32      | >10      | 29        | 7           | ++     | I   | 0 | MM      |
| #6  | 60 | F  | G  | 4       | 3        | 2         | 0.1         | +++    | II  | 1 | MM      |
| #7  | 60 | F  | A  | 26      | 1        | 10        | 2           | +++    | I   | 0 | MM      |
| #8  | 61 | M  | G  | 28      | 0        | 23        | 9           | +++    | II  | 0 | MM      |
| #9  | 62 | M  | G  | 69      | >10      | 30        | 10          | ++     | II  | 0 | MM      |
| #10 | 62 | F  | G  | 70      | >10      | 80        | 35          | +      | III | 1 | MM      |
| #11 | 68 | M  | A  | 36      | >10      | 60        | 6           | +++    | I   | 0 | MM      |
| #12 | 69 | M  | -  | -       | 3        | 50        | 2           | +++/** | I   | 1 | 非分泌性MM  |
| #13 | 71 | M  | G  | 26      | 0        | 30        | 11          | +++    | I   | 0 | MM      |
| #14 | 72 | M  | G  | 13      | 0        | 29        | 10          | +++    | I   | 0 | MM      |
| #15 | 74 | M  | G  | 20      | 0        | 23        | 7           | +++    | I   | 0 | MM      |
| #16 | 75 | M  | A  | 40      | 0        | 78        | 77          | ++     | II  | 0 | MM      |
| #17 | 77 | M  | G  | 45      | 0        | 34        | 13          | +++    | II  | 0 | MM      |
| #18 | 79 | F  | G  | 23      | 0        | 16        | 6           | +++    | I   | 0 | MM      |
| #19 | 79 | M  | G  | 24      | 7        | 50        | 24          | +++    | III | 0 | MM      |
| #19 | 79 | M  | G  | 3       | ND       | ND        | 5           | +++    |     | 1 | MM      |
| #19 | 80 | M  | G  | 3       | ND       | 16        | 6           | +++    |     | 2 | MM      |
| #20 | 82 | M  | A  | 29      | 0        | 44        | 20          | +++    | III | 0 | MM      |
| #21 | 83 | F  | G  | 39      | 0        | 89        | 64          | +++    | III | 0 | MM      |
| #22 | 84 | M  | A  | 17      | 0        | 38        | 22          | +++    | III | 0 | MM      |
| #23 | 61 | M  | A  | 7       | 2        | 24        | 15          | ++     |     | 0 | AL      |
| #24 | 64 | F  | -  | -       | -        | 6         | 0.3         | +++    |     | 0 | AL      |
| #25 | 72 | F  | -  | -       | 0        |           |             | +++    |     | 0 | LCDD/MM |
| #26 | 61 | F  | A  | 42      | 99       | 80        | 78          | +++    |     | 4 | 浆细胞白血病  |
| #27 | 75 | M  | G  | 18      | >10      | 8         | 30          | +      |     | 4 | 浆细胞白血病  |
| #28 | 52 | M  | G  | 1       | 1        | 5         | 0.4         | +++    |     | 1 | PC      |
| #29 | 60 | F  | G  | 4       | 1        | 2         | 0.1         | +++    |     | 1 | PC      |

图4A

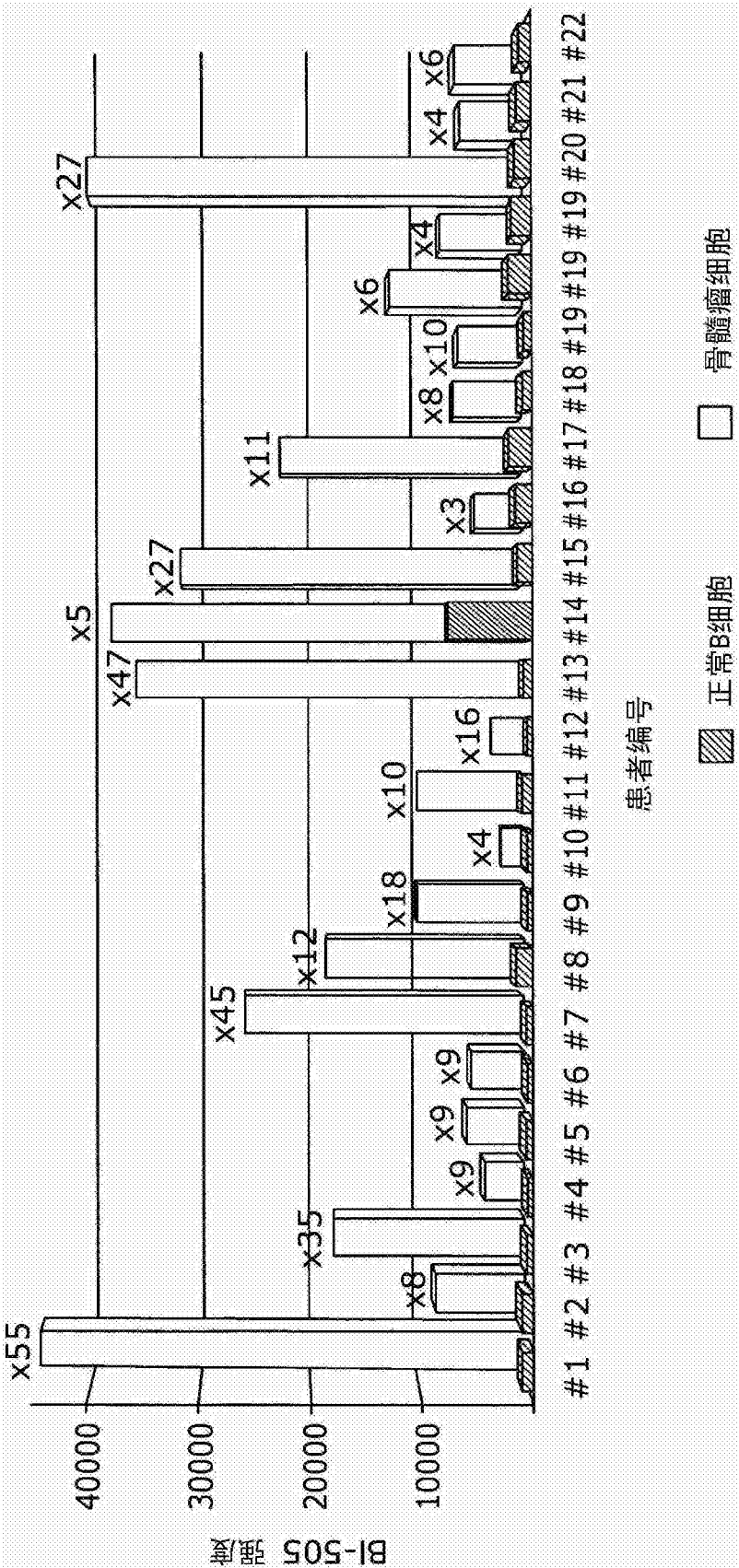


图4B

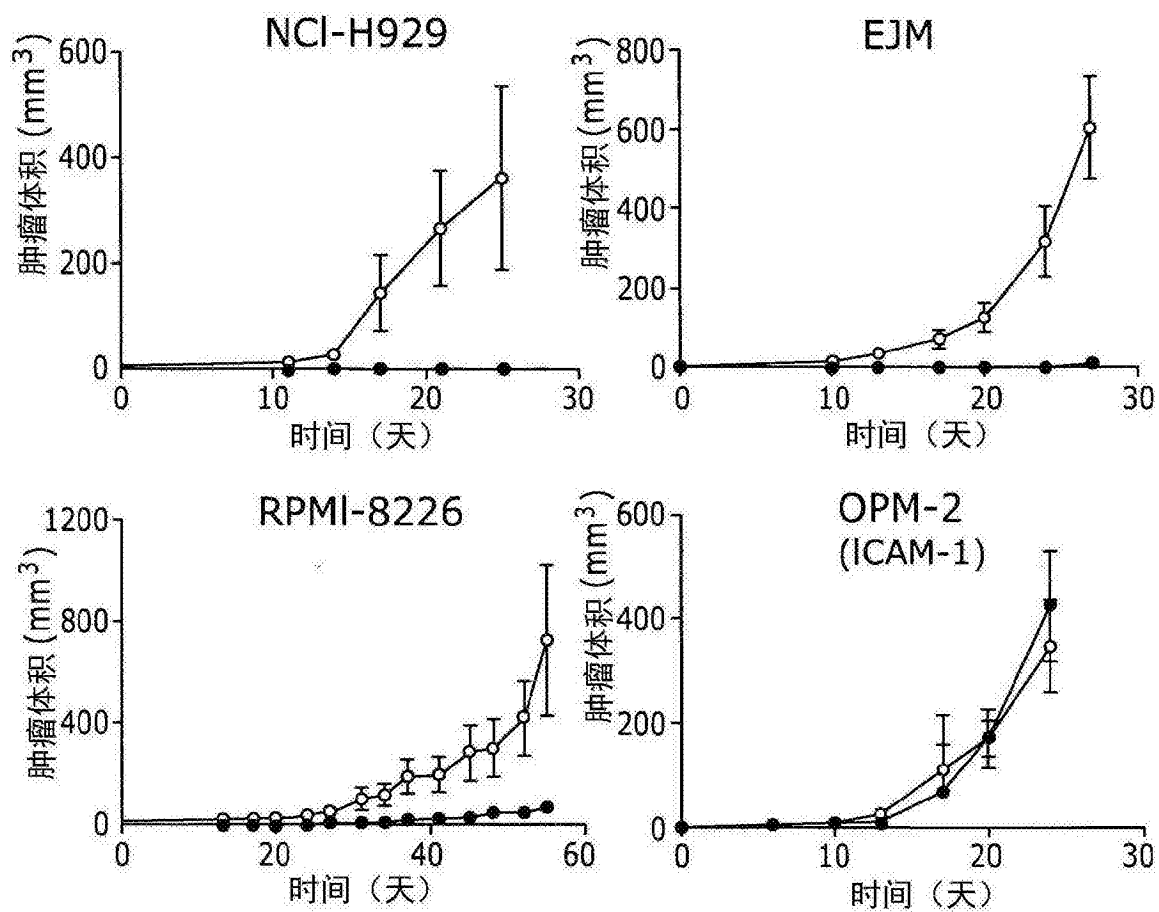


图5A

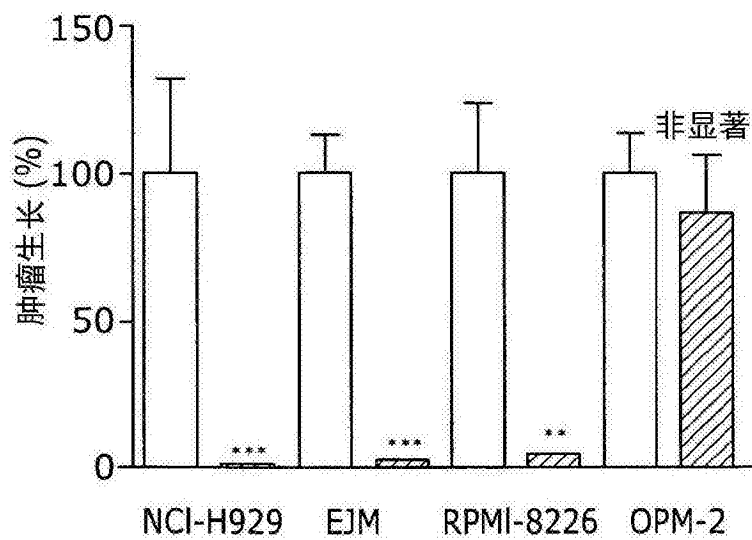


图5B



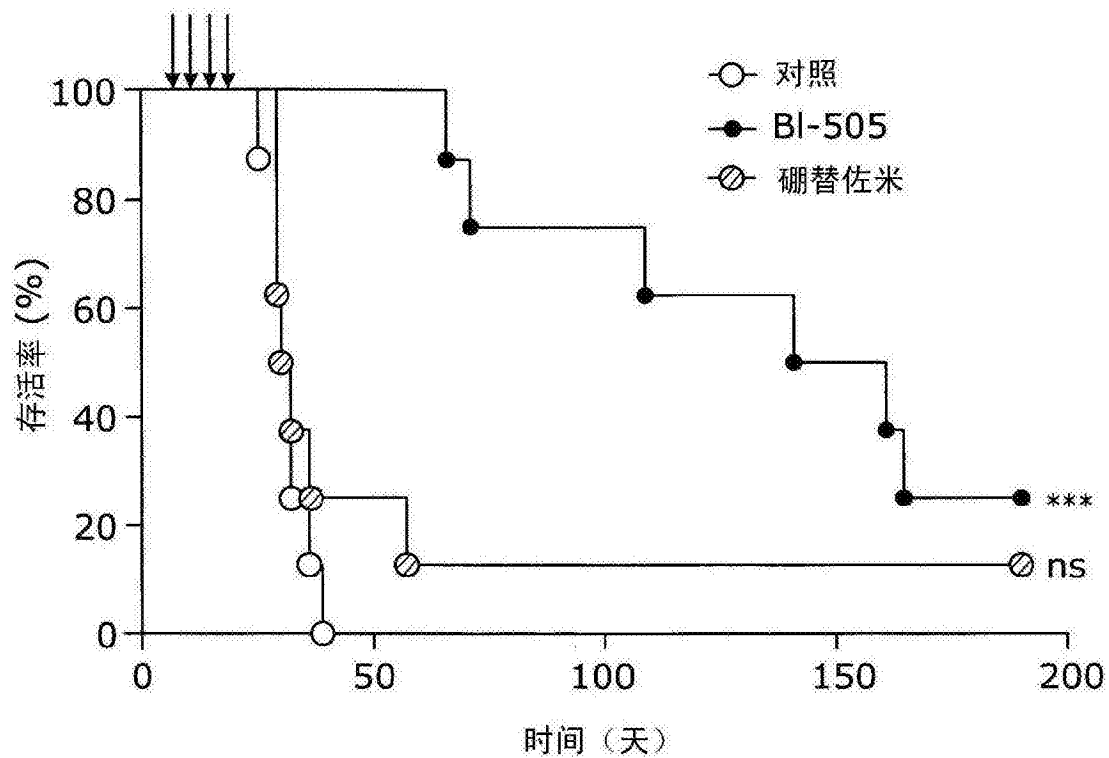


图6A

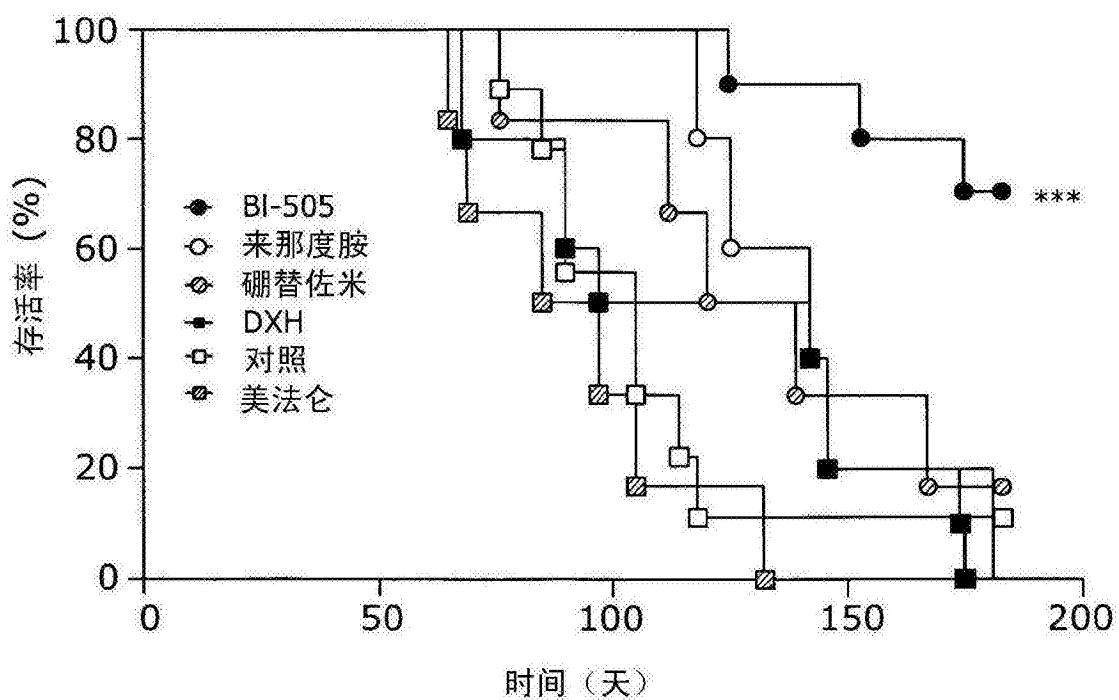


图6B

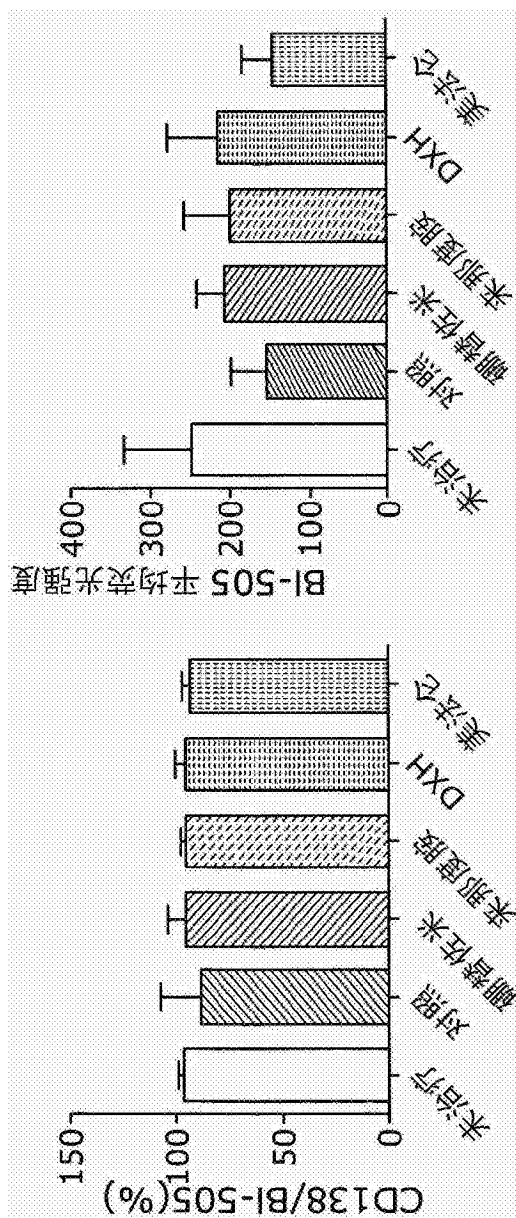


图6C

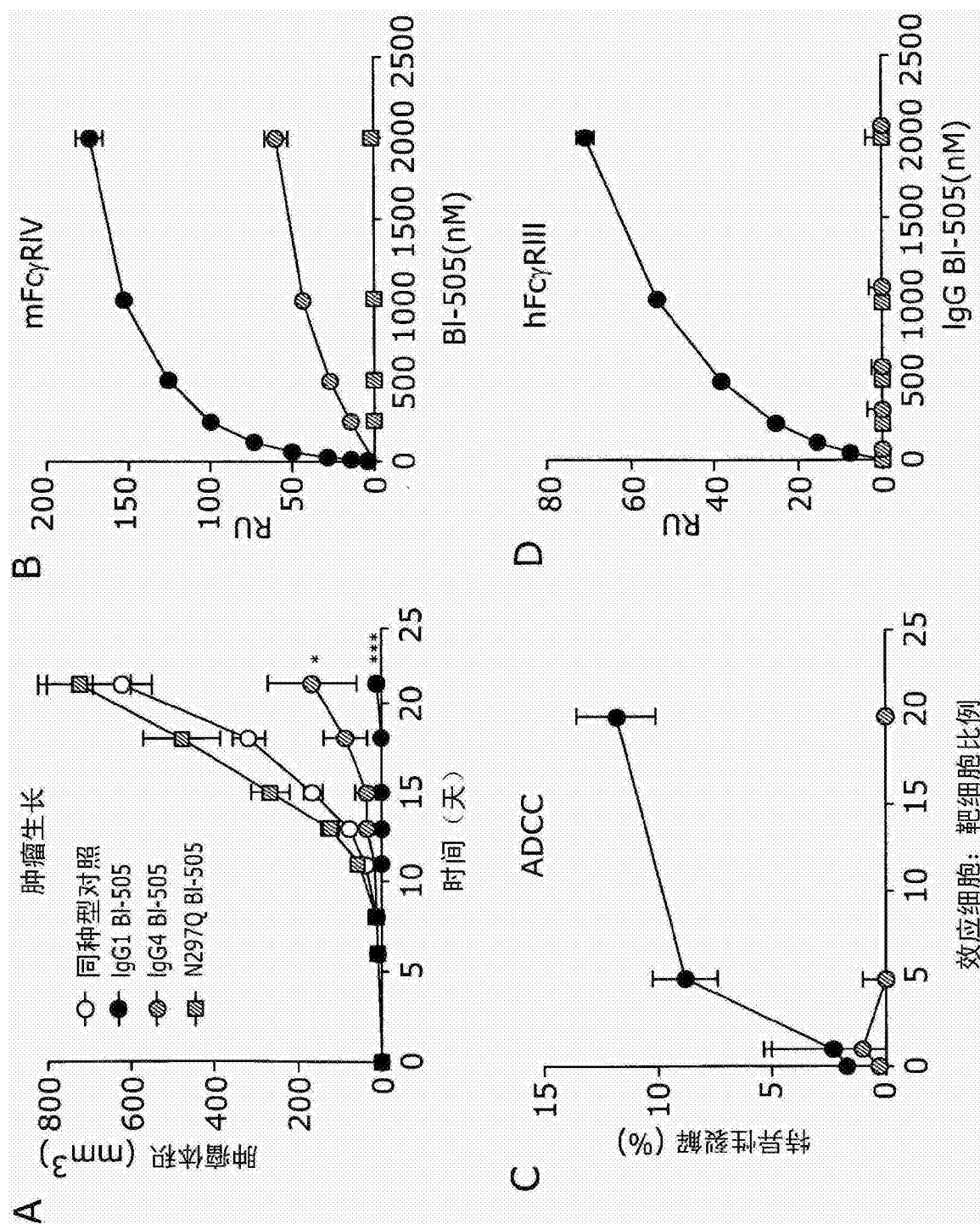


图7

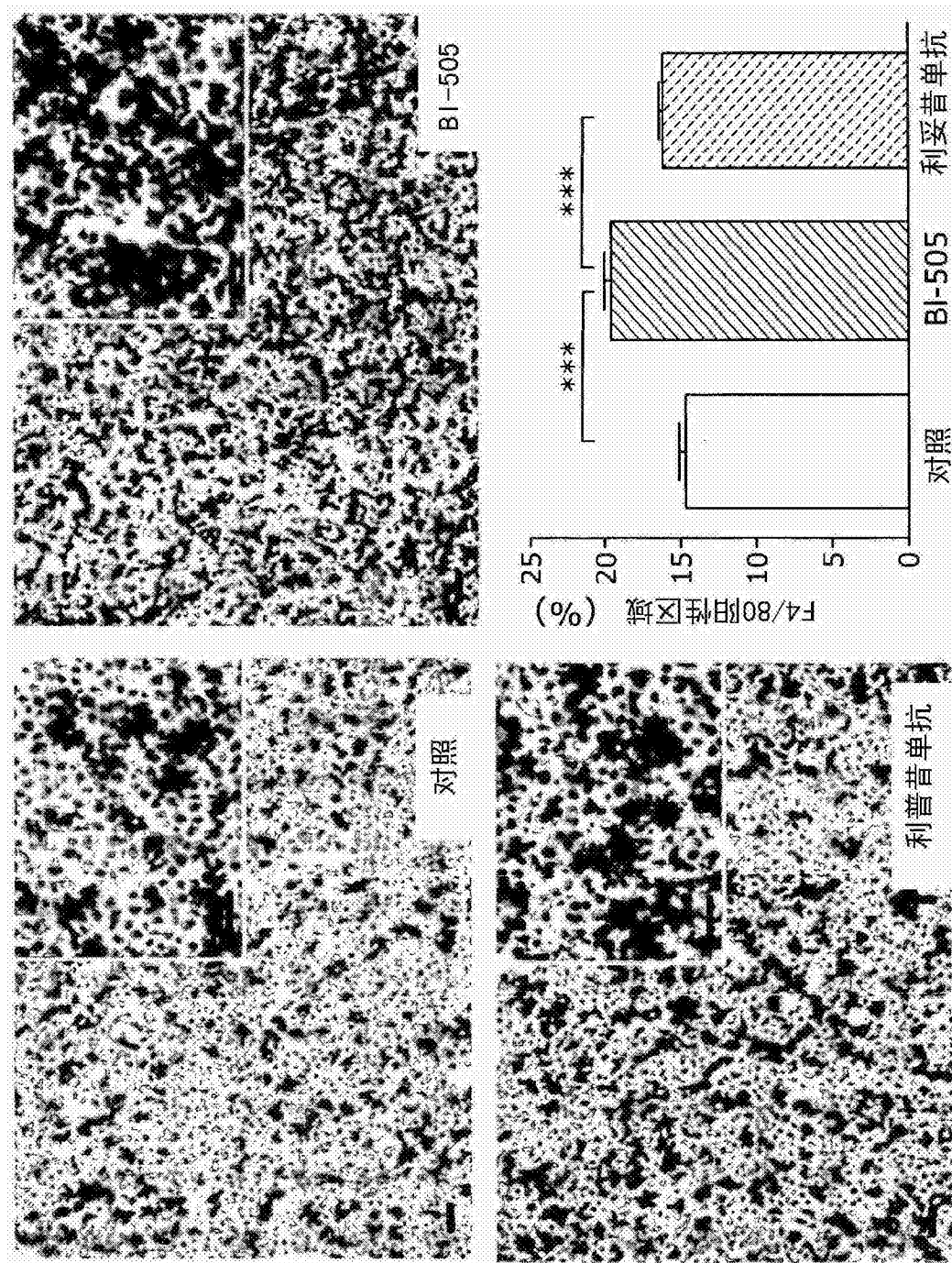


图7E

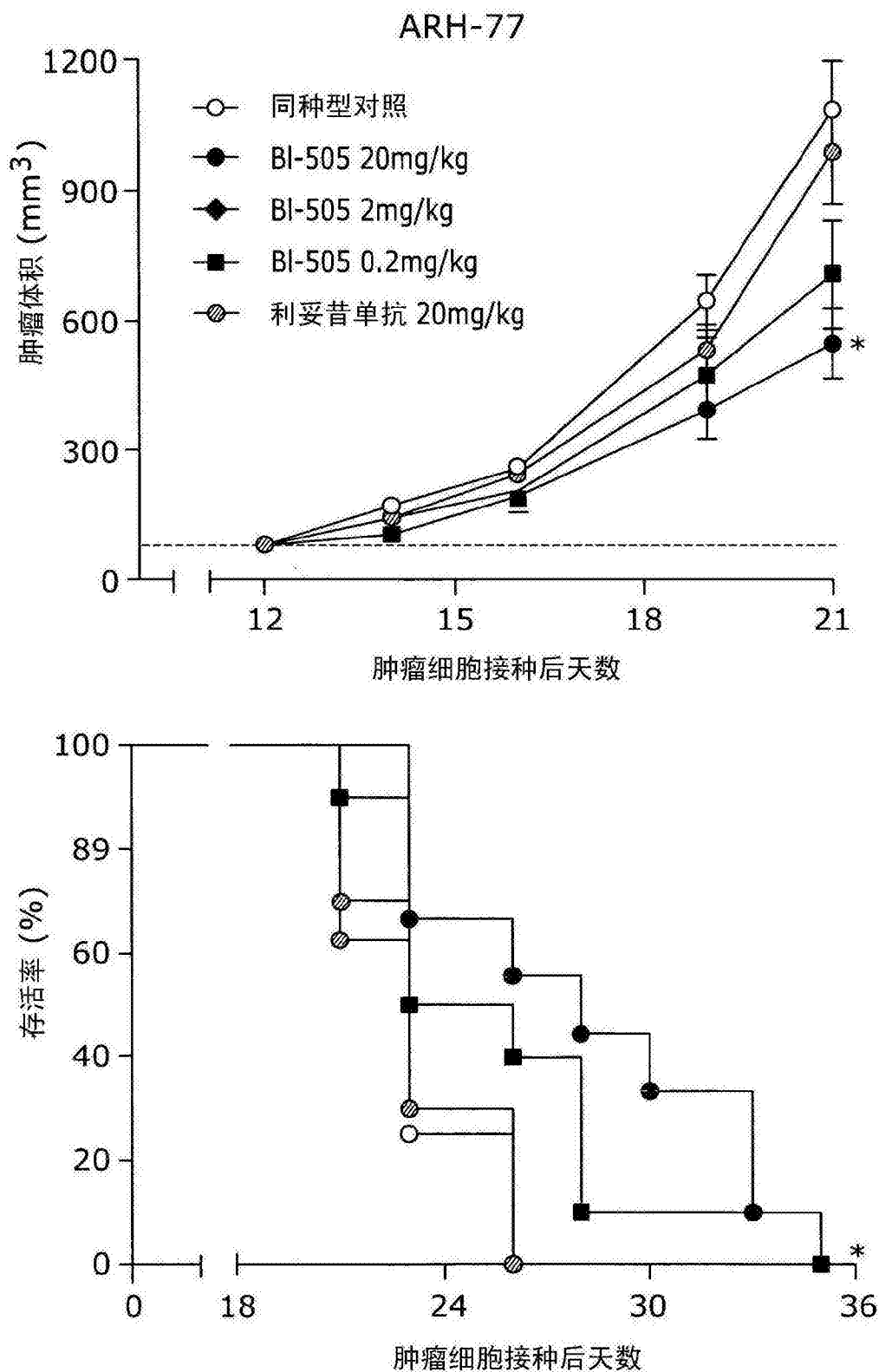


图8A

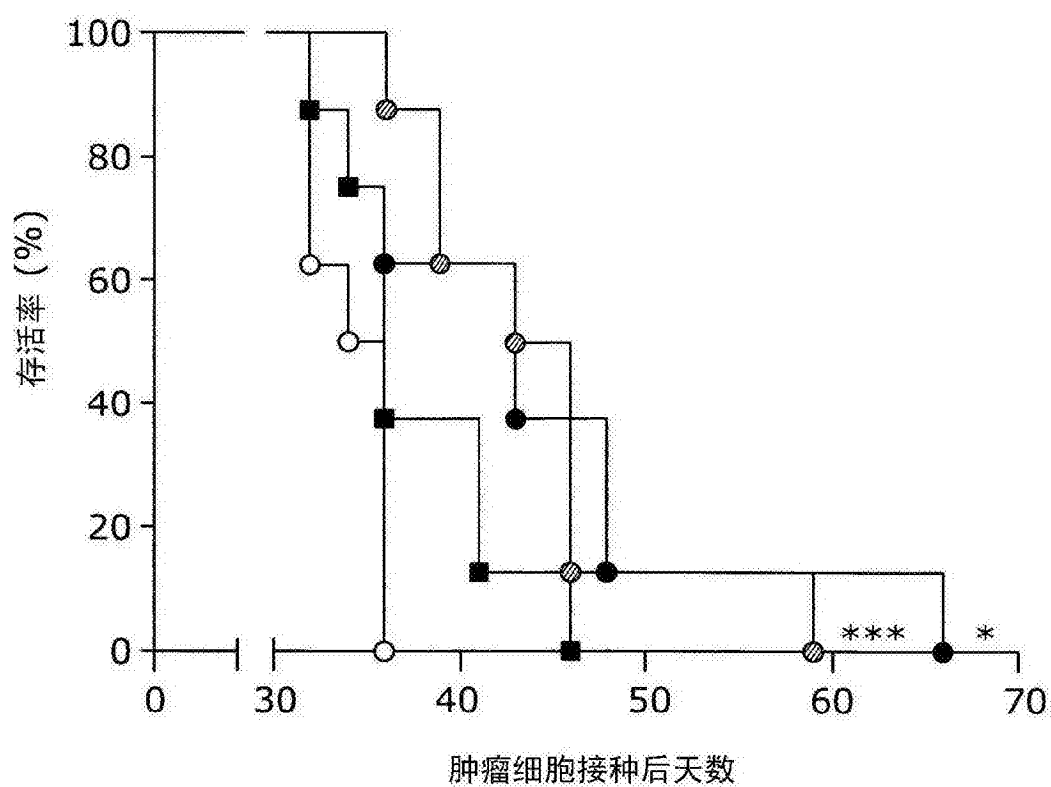
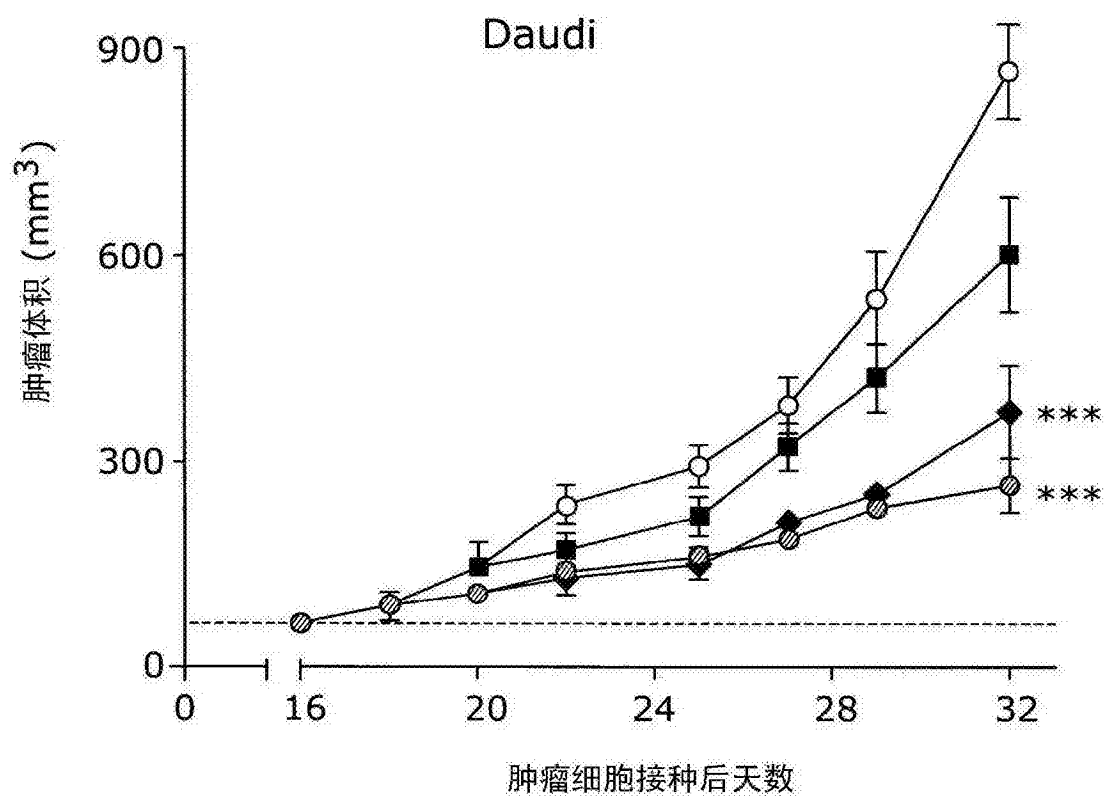


图8B

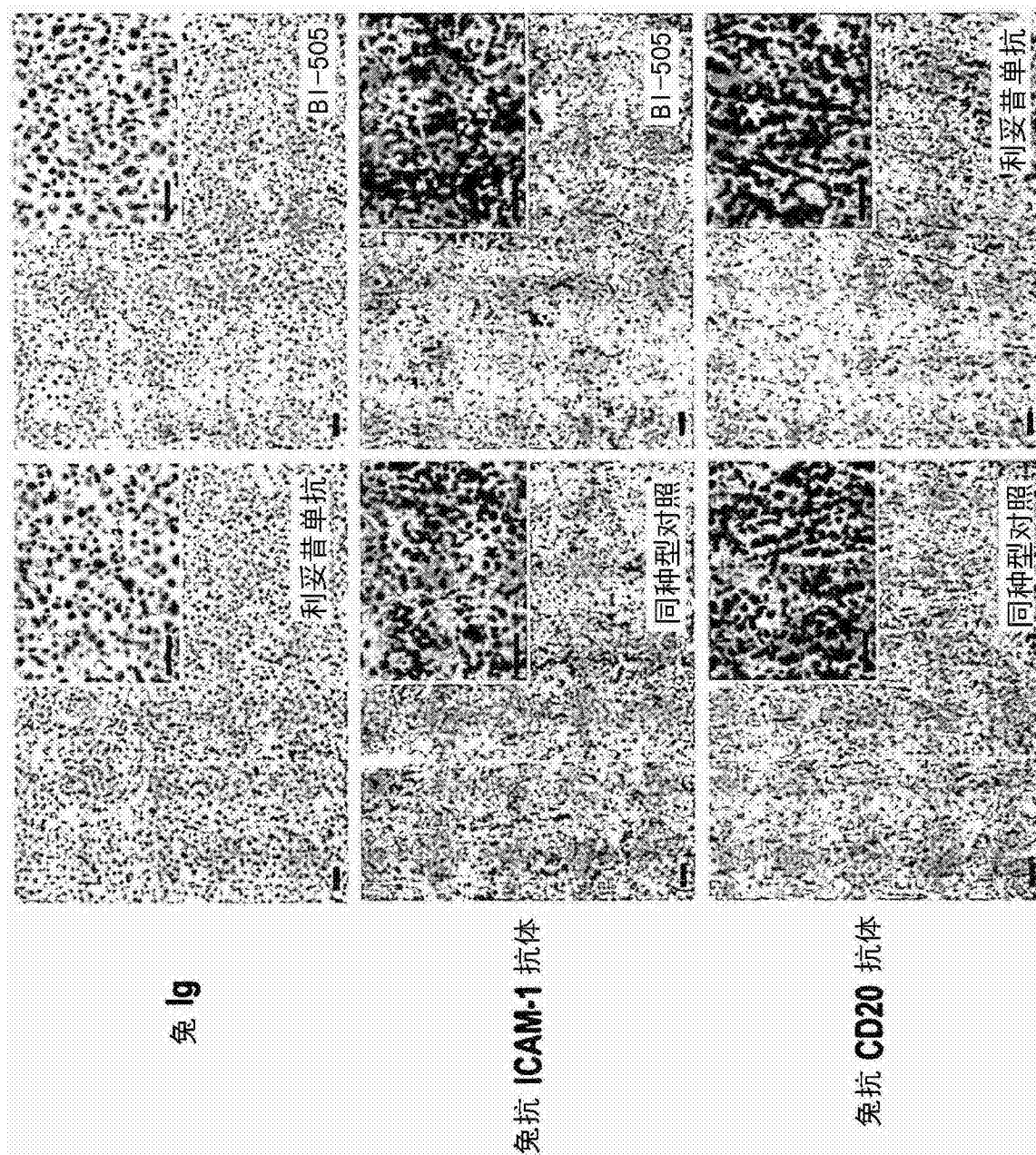


图9

| 多发性骨髓瘤骨髓免疫表型染色组 |       |       |                 |       |
|-----------------|-------|-------|-----------------|-------|
| 荧光素             | 抗体表位  |       |                 |       |
|                 | 组 1   | 组 2   | 组 3             | 组 4   |
| FITC            | CD38  | CD38  | CD38            | C λ   |
| PE              | CD117 | CD27  | CD10            | C κ   |
| PerCP-Cy5-5     | CD138 | CD138 | CD138           | CD138 |
| PE-Cy7          | CD56  | CD56  | CD56            | CD56  |
| APC             | CD20  | CD28  | BI-505 (ICAM-1) | CD38  |
| APC-Cy7         | CD19  | CD19  | CD19            | CD19  |
| 太平洋蓝            | CD45  | CD45  | CD45            | CD45  |

图10A



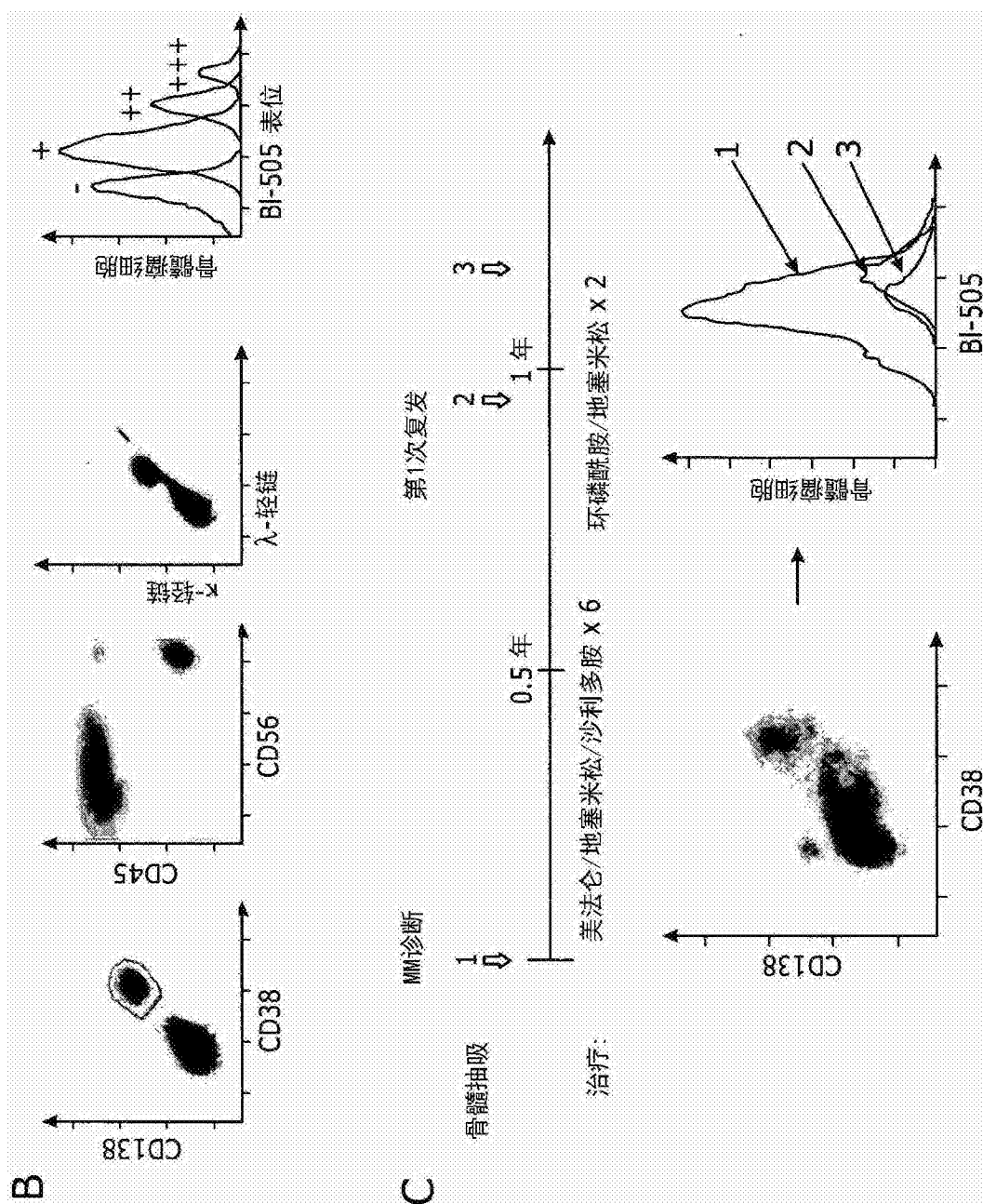


图10

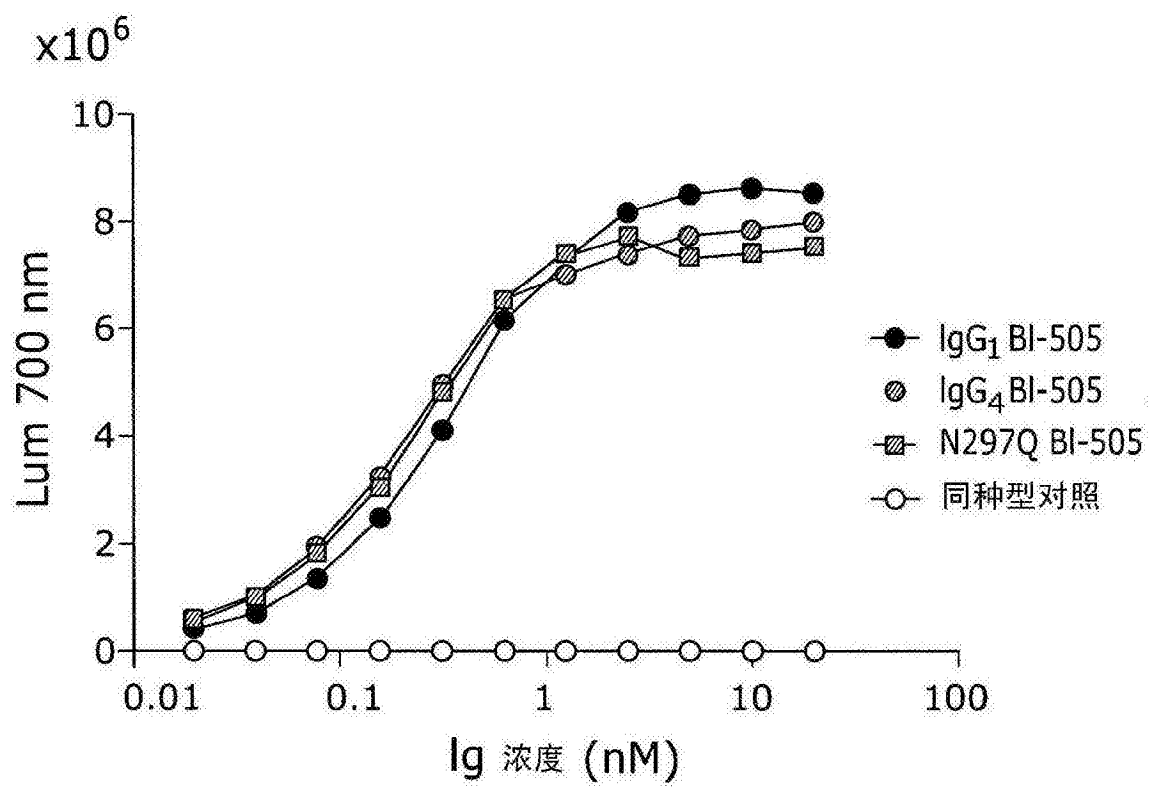


图11

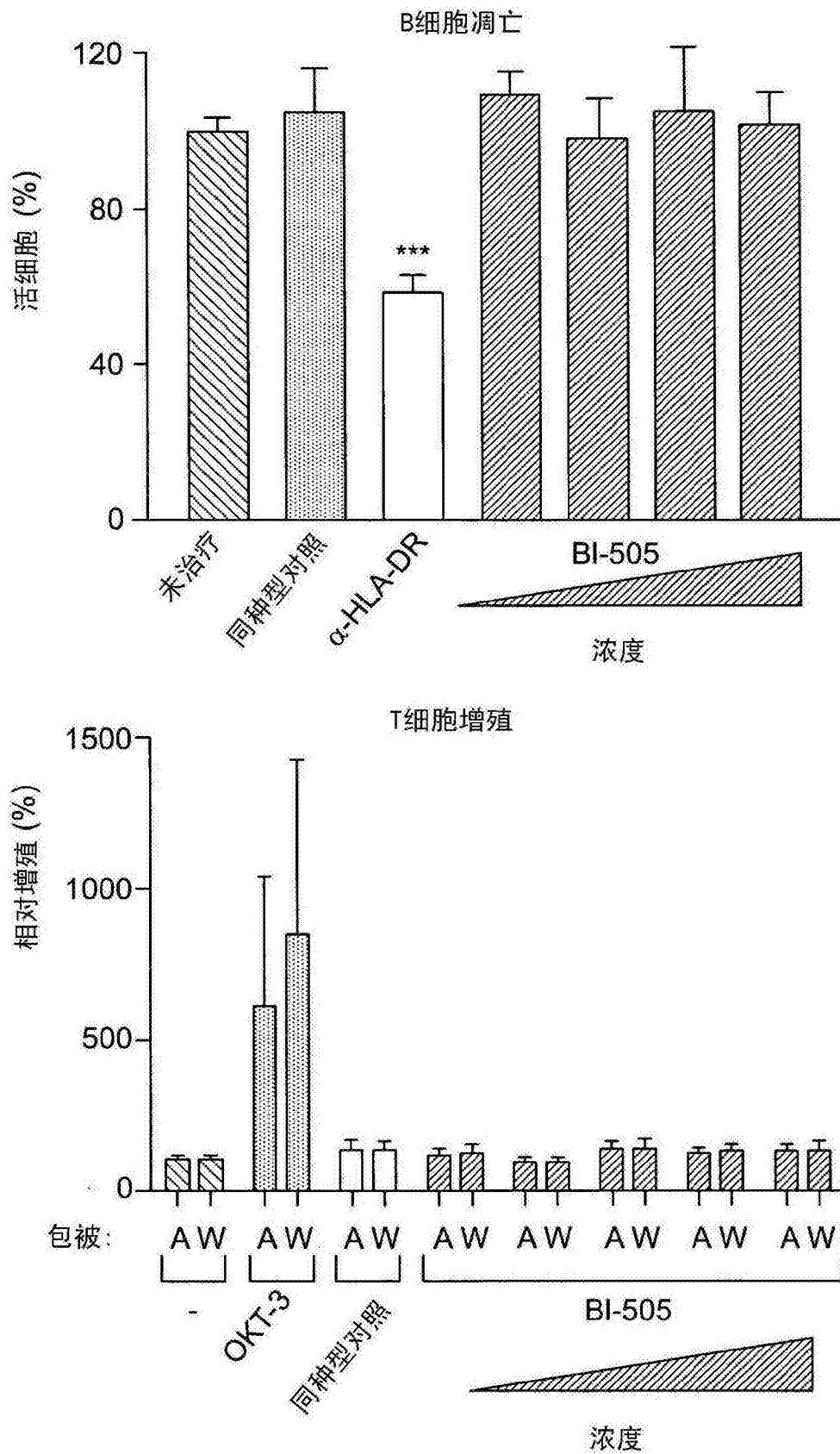


图12

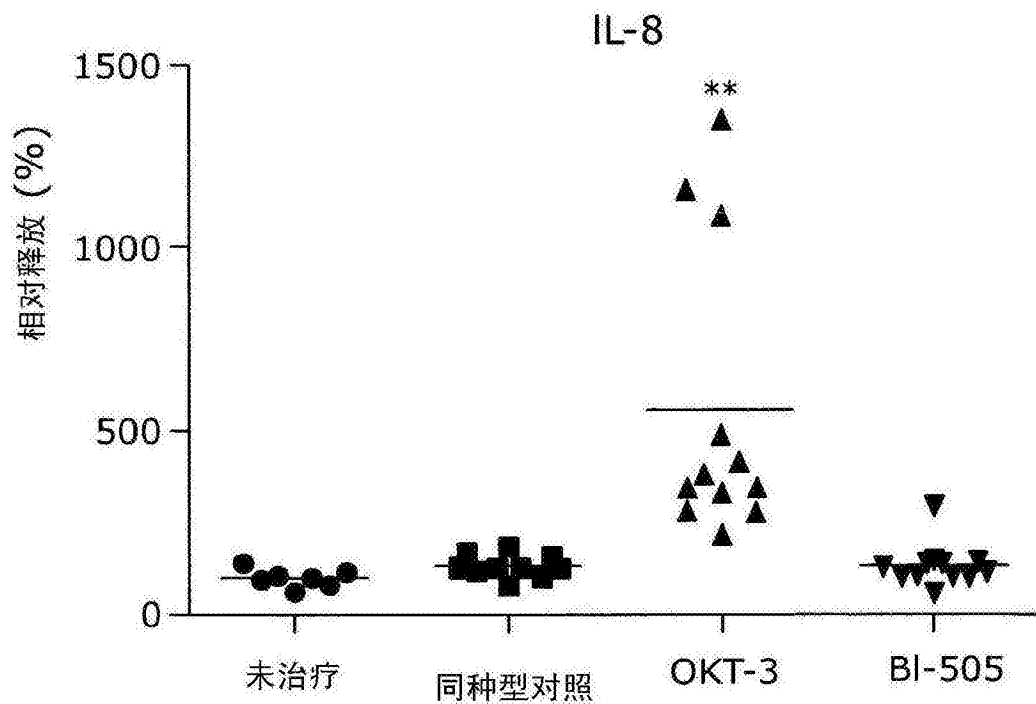
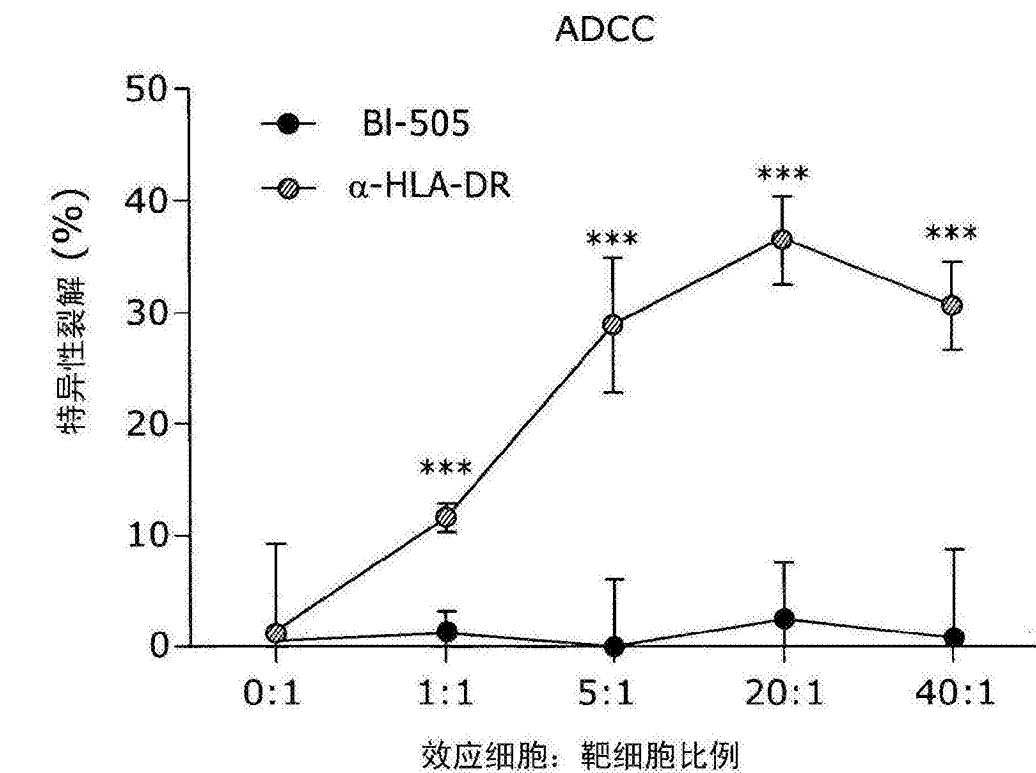


图12(续)

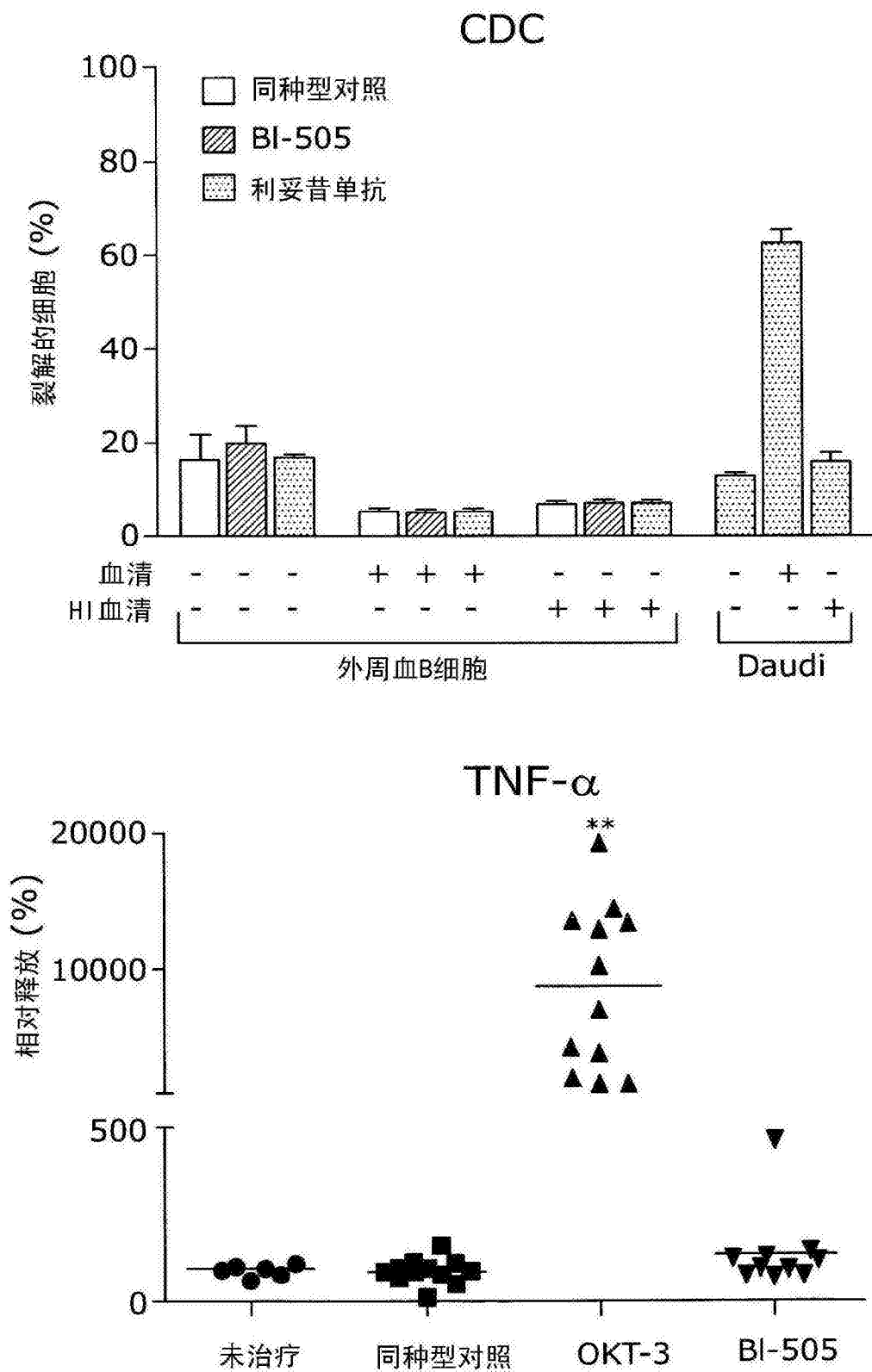


图12续

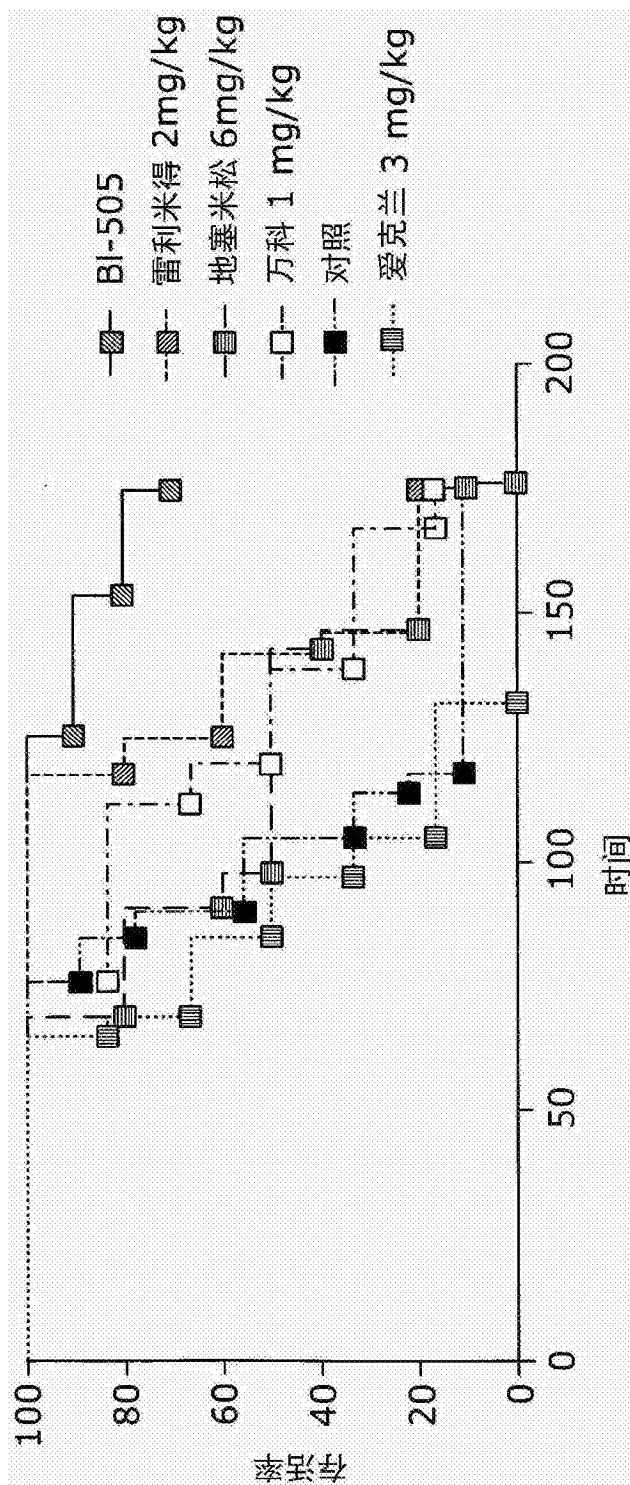


图13

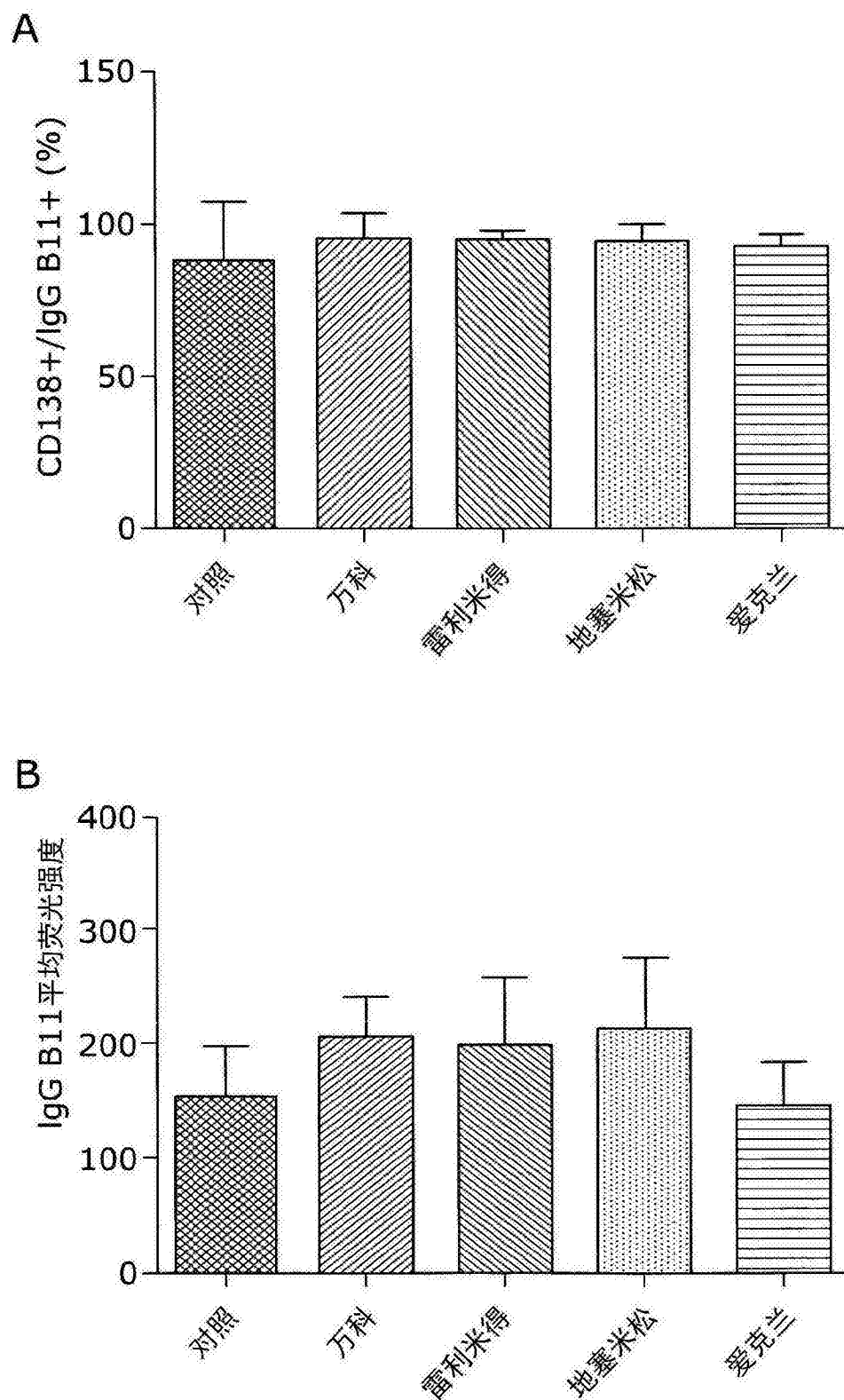


图14

**B11-VH**

核苷酸序列:

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG  
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTC  
AGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG  
GGGCTGGAGTGGGTGGCATTATATGTTATGATGGAAGTAATA  
AATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAG  
AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG  
AGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGATACAGTG  
GCTGGTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGTACACTGGTCACCGT  
GAGCTCA

氨基酸序列:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGK  
GLEWVAFIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR  
AEDTAVYYCARYSGWYFDYWGGTLTVSS

图15

**B11-VL**

核苷酸序列:

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCG  
GGCAGAGGGTCACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACAT  
CGGGGCAGGTTATGATGTACACTGGTATCAGCAGCTCCCAGGA  
ACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGATAACAACAATCGGCCCT  
CAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTC  
AGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCT  
GATTATTACTGCCAGTCCTATGACAGCAGCCTCAGTGCTTGGC  
TGTTCCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

氨基酸序列:

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTA  
PKLLIYDNNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQ  
SYDSSLSAWLFGGGTKLTVLG

图15(续)