

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580038186.9

[51] Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 12 月 26 日

[11] 公开号 CN 101094868A

[22] 申请日 2005.9.2

[21] 申请号 200580038186.9

[30] 优先权

[32] 2004.9.3 [33] US [31] 60/607,377

[86] 国际申请 PCT/US2005/031401 2005.9.2

[87] 国际公布 WO2006/026759 英 2006.3.9

[85] 进入国家阶段日期 2007.5.8

[71] 申请人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 马克·S·丹尼斯 方湘文

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 张红春

权利要求书 7 页 说明书 131 页 附图 21 页

[54] 发明名称

人源化的抗 - $\beta 7$ 拮抗剂及其应用

[57] 摘要

本发明提供了治疗性的抗 - $\beta 7$ 抗体、含这些抗体的组合物、和应用这些抗体的方法。

1. 抗- β 7 的结合多肽或抗体, 其包含:

(a) 至少一个 HVR 序列, 其选自由下列所组成的组:

(i) HVR-L1, 其含序列 A1-A11, 其中 A1-A11 为 RASESVDTYLH (SEQ ID NO: 1)

(ii) HVR-L2, 其含序列 B1-B8, 其中 B1-B8 为 KYASQSIG (SEQ ID NO: 2)

(iii) HVR-L3, 其含序列 C1-C10, 其中 C1-C10 为 QQGNSLLPNT (SEQ ID NO: 3)

(iv) HVR-H1, 其含序列 D1-D10, 其中 D1-D10 为 GFFITNNYWG (SEQ ID NO: 4)

(v) HVR-H2, 其含序列 E1-E17, 其中 E1-E17 为 GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 5); 和

(vi) HVR-H3, 其含序列 F1-F11, 其中 F1-F11 为 MTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 6)。

2. 权利要求 1 的多肽或抗体, 其包含至少一个变体 HVR, 其中变体 HVR 包含 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5 或 6 所述序列之任意序列的至少一个残基的修饰。

3. 权利要求 2 的多肽或抗体, 其中变体 HVR-L1 中的 A8 是 S、D 或 T, 而且 A9 是 L。

4. 权利要求 2 的多肽或抗体, 其中 HVR-L1 包含 SEQ ID NO: 1 或 7 或 8 或 9, HVR-L2 包含 SEQ ID NO: 2 或 67 或 68, HVR-L3 包含 SEQ ID NO: 3, HVR-H1 包含 SEQ ID NO: 4, HVR-H2 包含 SEQ ID NO: 5, 而且 HVR-H3 在对应的第 F2-F11 位上包含 SEQ ID NO: 6 或 66 或者在对应的第 F1-F11 位上包含 SEQ ID NO: 63 或 64 或 65。

5. 权利要求 2 的多肽或抗体, 其中多肽或抗体包含一、二、三、四、五或六个高变区 (HVR), 其选自由 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3 组成的组, 其中:

(i) HVR-L1, 其含氨基酸序列 A1-A11, 其中 A1-A11 为 RASESVDTYLH (SEQ ID NO: 1)、RASESVDSSLH (SEQ ID NO: 7)、RASESVDTLH (SEQ

ID NO: 8)、或 RASESVDDLLH (SEQ ID NO: 9)或 SEQ ID NO: 1、7、8 或 9 的变体, 所述变体中氨基酸 A2 选自由 A、G、S、T、和 V 组成的组, 和/或氨基酸 A3 选自由 S、G、I、K、N、P、Q、R 和 T 组成的组, 和/或 A4 选自由 E、V、Q、A、D、G、H、I、K、L、N、和 R 组成的组, 和/或氨基酸 A5 选自由 S、Y、A、D、G、H、I、K、N、P、R、T、和 V 组成的组, 和/或氨基酸 A6 选自由 V、R、I、A、G、K、L、M、和 Q 组成的组, 和/或氨基酸 A7 选自由 D、V、S、A、E、G、H、I、K、L、N、P、S、和 T 组成的组, 和/或氨基酸 A8 选自由 D、G、N、E、T、P 和 S 组成的组, 和/或氨基酸 A9 选自由 L、Y、I 和 M 组成的组, 和/或氨基酸 A10 选自由 L、A、I、M、和 V 组成的组, 和/或氨基酸 A11 选自由 H、Y、F、和 S 组成的组;

(ii) HVR-L2, 其含氨基酸序列 B1-B8, 其中 B1-B8 为 KYASQISIS (SEQ ID NO: 2)、RYASQISIS (SEQ ID NO: 67、或 XYASQISIS (SEQ ID NO: 68, 其中 X 表示任意氨基酸)或 SEQ ID NO: 2、67 或 68 的变体, 所述变体中氨基酸 B1 选自由 K、R、N、V、A、F、Q、H、P、I、L、Y 和 X (其中 X 表示任意氨基酸) 组成的组, 和/或氨基酸 B4 选自由 S 和 D 组成的组, 和/或氨基酸 B5 选自由 Q 和 S 组成的组, 和/或氨基酸 B6 选自由 S、D、L、和 R 组成的组, 和/或氨基酸 B7 选自由 I、V、E、和 K 组成的组;

(iii) HVR-L3, 其含氨基酸序列 C1-C9, 其中 C1-C9 为 QQGNLSPNT (SEQ ID NO: 3)或 SEQ ID NO: 3 的变体, 所述变体中氨基酸 C8 选自由 N、V、W、Y、R、S、T、A、F、H、I、L、M、和 Y 组成的组;

(iv) HVR-H1, 其含氨基酸序列 D1-D10, 其中 D1-D10 为 GFFITNNYWG (SEQ ID NO: 4);

(v) HVR-H2, 其含氨基酸序列 E1-E17, 其中 E1-E17 为 GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 5)、或 SEQ ID NO: 5 的变体, 所述变体中氨基酸 E2 选自由 Y、F、V、和 D 组成的组, 和/或氨基酸 E6 选自由 S 和 G 组成的组, 和/或氨基酸 E10 选自由 S 和 Y 组成的组, 和/或氨基酸 E12 选自由 N、T、A、和 D 组成的组, 和/或氨基酸 E13 选自由 P、H、D、和 A 组成的组, 和/或氨基酸 E15 选自由 L 和 V 组成的组, 和/或氨基酸 E17 选自由 S 和 G 组成的组; 和

(vi) HVR-H3, 其含氨基酸序列 F2-F11, 其中 F2 -F11 为 MTGSSGYFDF

(SEQ ID NO: 6)或 RTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 66); 或含氨基酸序列 F1-F11, 其中 F1-F11 为 AMTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 63)、ARTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 64)、或 AQTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 65), 或 SEQ ID NO: 6、63、64、65、或 66 的变体, 所述变体中氨基酸 F2 为 R、M、A、E、G、Q、S, 和/或氨基酸 F11 选自由 F 和 Y 组成的组。

6. 权利要求 2 的多肽或抗体, 其中抗体是人源化的。

7. 权利要求 2 的多肽或抗体, 其中至少一部分框架序列是人共有框架序列。

8. 权利要求 2 的多肽或抗体, 其中所述修饰是替换、插入或缺失。

9. 权利要求 2 的多肽或抗体, 其中 HVR-L1 变体在以下任意组合的位置上含 1-10 (1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10) 个替换: A2 (A、G、S、T、或 V); A3 (S、G、I、K、N、P、Q、R、或 T)、A4 (E、A、D、G、H、I、K、L、N、Q、R、或 V)、A5 (S、A、D、G、H、I、K、N、P、R、T、V、或 Y)、A6 (V、A、G、I、K、L、M、Q、或 R)、A7 (D、A、E、G、H、I、K、L、N、P、S、T、或 V)、A8 (S、D、E、G、P、T 或 N)、A9 (L、Y、I、或 M)、A10 (L、A、I、M、或 V)、和 A11 (H、F、S、或 Y)。

10. 权利要求 2 的多肽或抗体, 其中 HVR-L2 变体在以下任意组合的位置上含 1-4 (1、2、3、或 4) 个替换: B1 (K、R、N、V、A、F、Q、H、P、I、L、Y、T、H、S、E、C、D、G、或 M)、B5 (Q 或 S)、B6 (S、R 或 L)、和 B7 (I、T、E、K、或 V)。

11. 权利要求 2 的多肽或抗体, 其中 HVR-L3 变体在 C8 位置上含至少一个替换(W、Y、R、S、A、F、H、I、L、M、N、T、或 V)。

12. 权利要求 2 的多肽或抗体, 其中 HVR-H2 变体在以下任意组合的位置上含 1-7 (1、2、3、4、5、6、或 7) 个替换: E2 (Y、V、D、或 F)、E6 (S 或 G)、E10 (S 或 Y)、E12 (N、A、D、或 T)、E13 (P、D、A、或 H)、E15 (L 或 V)、E17 (S 或 G)。

13. 权利要求 2 的多肽或抗体, 其中 HVR-H3 变体在以下任意组合的位置上含 1 或 2 个替换: F2 (R、M、A、E、G、Q、R、或 S)、和 F11 (F 或 Y)。

14. 权利要求 2 的多肽或抗体, 其含具有 SEQ ID NO: 7 序列的 HVR-L1。

15. 权利要求 2 的多肽或抗体, 其含具有 SEQ ID NO: 8 序列的 HVR-L1。

16. 权利要求 2 的多肽或抗体, 其含具有 SEQ ID NO: 9 序列的 HVR-L1。

17. 权利要求 2 的多肽或抗体, 其进一步在框架位置上含至少一个修饰, 其中该至少一个修饰是在重链第 71 或 73 或 78 位上。

18. 权利要求 17 的多肽或抗体, 其中第 71 位上的氨基酸是 R 或 A, 而且第 73 位上的氨基酸是 N 或 T, 而且第 78 位上的氨基酸是 F 或 A 或 L。

19. 权利要求 17 的多肽或抗体, 其含重链人亚型 III 重链共有框架序列, 其在第 71、73 和/或 78 位上包含替换。

20. 权利要求 19 的抗体, 其中替换是 R71A、N73T、L78A 或 L78F。

21. 权利要求 2 的多肽或抗体, 其含具有 SEQ ID NO: 3 序列的 HVR-L3。

22. 权利要求 2 的多肽或抗体, 其中变体 HVR-L1 中的 A8 为 S。

23. 权利要求 2 的多肽或抗体, 其中变体 HVR-L1 中的 A8 为 D。

24. 权利要求 2 的多肽或抗体, 其中变体 HVR-L1 中的 A9 为 L。

25. 权利要求 2 的多肽或抗体, 其中在序列 HVR-H2 第 E1-E1 位和 HVR-H3 第 F1-F11 位之间的框架序列是 HFR3-1-HFR3-31, 并且其中 HFR3-6 是 A 或 R, HFR3-8 是 N 或 T, 而且 HFR3-13 是 L 或 A 或 F。

26. 人源化抗- $\beta 7$ 抗体、或其 $\beta 7$ 结合片段, 其中抗体或结合片段对于人 $\beta 7$ 的单价亲和力基本等于或大于含有如图 1A (SEQ ID NO: 10)和/或图 1B (SEQ ID NO: 11)、或图 9A (SEQ ID NO: 12)和/或图 9B (SEQ ID NO: 13)所述轻链和重链可变序列的抗体的单价亲和力。

27. 权利要求 26 的抗体或其结合片段, 其中亲和力大于含有图 1A (SEQ ID NO: 10)和图 1B (SEQ ID NO: 11)、或图 9A (SEQ ID NO: 12)和图 9B (SEQ ID NO: 13)所述轻链和重链序列的抗体至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、至少 50 倍、至少 100 倍、至少 500 倍、至少 1000 倍、至少 5000 倍、或至少 10, 000 倍。

28. 权利要求 27 的抗体或结合片段, 其中抗体对于人 $\beta 7$ 的单价亲和力大于含有图 1A (SEQ ID NO: 10)和图 1B (SEQ ID NO: 11)、或图 9A (SEQ ID NO: 12)和图 9B (SEQ ID NO: 13)所述轻链和重链序列的抗体的单价亲

和力至少 3 倍。

29. 权利要求 26 或 27 的抗体或结合片段，其中含有图 1A (SEQ ID NO: 10)和图 1B (SEQ ID NO: 11)、或图 9A (SEQ ID NO: 12)和图 9B (SEQ ID NO: 13)所述轻链和重链序列的抗体由美国典型培养物保藏中心保藏的登录号为 ATCC HB-293 的杂交瘤细胞系产生。

30. 权利要求 26 的抗体或结合片段，其中结合亲和力以 Kd 值表示。

31. 权利要求 26 的抗体或结合片段，其中结合亲和力由 Biacore™或放射免疫测试来测定。

32. 权利要求 1 的多肽或抗体，其含人 κ 亚型 1 轻链共有框架序列。

33. 权利要求 1 的多肽或抗体，其含重链人亚型 III 重链共有框架序列。

34. 权利要求 26 的抗体或结合片段，其中多肽或抗体包含一、二、三、四、五或六个高变区 (HVR)，其选自由 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3 组成的组，其中：

(i)HVR-L1，其含氨基酸序列 A1-A11，其中 A1-A11 为 RASESVDTYLH (SEQ ID NO: 1)、RASESVDSLH (SEQ ID NO: 7)、RASESVDTLH (SEQ ID NO: 8)、或 RASESVDDLH (SEQ ID NO: 9)或 SEQ ID NO: 1、7、8 或 9 的变体，所述变体中氨基酸 A2 选自由 A、G、S、T、和 V 组成的组，和/或氨基酸 A3 选自由 S、G、I、K、N、P、Q、R、和 T 组成的组，和/或 A4 选自由 E、V、Q、A、D、G、H、I、K、L、N、和 R 组成的组，和/或氨基酸 A5 选自由 S、Y、A、D、G、H、I、K、N、P、R、T、和 V 组成的组，和/或氨基酸 A6 选自由 V、R、I、A、G、K、L、M、和 Q 组成的组，和/或氨基酸 A7 选自由 D、V、S、A、E、G、H、I、K、L、N、P、S、和 T 组成的组，和/或氨基酸 A8 选自由 D、G、N、E、T、P 和 S 组成的组，和/或氨基酸 A9 选自由 L、Y、I 和 M 组成的组，和/或氨基酸 A10 选自由 L、A、I、M、和 V 组成的组，和/或氨基酸 A11 选自由 H、Y、F、和 S 组成的组；

(ii) HVR-L2，其含氨基酸序列 B1-B8，其中 B1-B8 为 KYASQISIS (SEQ ID NO: 2)、RYASQISIS (SEQ ID NO: 67、或 XYASQISIS (SEQ ID NO: 68，其中 X 表示任意氨基酸)或 SEQ ID NO: 2、67 或 68 的变体，所述变体中氨基酸 B1 选自由 K、R、N、V、A、F、Q、H、P、I、L、Y 和 X (其中 X

表示任意氨基酸)组成的组,和/或氨基酸 B4 选自由 S 和 D 组成的组,和/或氨基酸 B5 选自由 Q 和 S 组成的组,和/或氨基酸 B6 选自由 S、D、L、和 R 组成的组,和/或氨基酸 B7 选自由 I、V、E、和 K 组成的组;

(iii) HVR-L3,其含氨基酸序列 C1-C9,其中 C1-C9 为 QQGNSLPNT (SEQ ID NO: 3)或 SEQ ID NO: 3 的变体,所述变体中氨基酸 C8 选自由 N、V、W、Y、R、S、T、A、F、H、I、L、M、和 Y 组成的组;

(iv) HVR-H1,其含氨基酸序列 D1-D10,其中 D1-D10 为 GFFITNNYWG (SEQ ID NO: 4);

(v) HVR-H2,其含氨基酸序列 E1-E17,其中 E1-E17 为 GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 5)、或 SEQ ID NO: 5 的变体,所述变体中氨基酸 E2 选自由 Y、F、V、和 D 组成的组,和/或氨基酸 E6 选自由 S 和 G 组成的组,和/或氨基酸 E10 选自由 S 和 Y 组成的组,和/或氨基酸 E12 选自由 N、T、A、和 D 组成的组,和/或氨基酸 E13 选自由 P、H、D、和 A 组成的组,和/或氨基酸 E15 选自由 L 和 V 组成的组,和/或氨基酸 E17 选自由 S 和 G 组成的组; 和

(vi) HVR-H3,其含氨基酸序列 F2-F11,其中 F2 -F11 为 MTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 6)或 RTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 66);或含氨基酸序列 F1-F11,其中 F1-F11 为 AMTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 63)、ARTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 64)、或 AQTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 65),或 SEQ ID NO: 6、63、64、65、或 66 的变体,所述变体中氨基酸 F2 为 R、M、A、E、G、Q、S、和/或氨基酸 F11 选自由 F 和 Y 组成的组。

35. 权利要求 34 的抗体或或结合片段,其中重链框架的第 71 位含氨基酸 R 或 A,和/或重链框架的第 73 位含 T 或 N,和/或重链框架的第 78 位含 F 或 A 或 L。

36. 抑制人 β 7 整联蛋白亚基同第二整联蛋白亚基和/或配体相互作用的方法,其通过将权利要求 2 的抗体与 β 7 整联蛋白接触来进行。

37. 权利要求 36 的方法,其中所述第二整联蛋白亚基是 α 4 整联蛋白亚基,而且其中所述配体是 MAdCAM、VCAM 或纤连蛋白。

38. 权利要求 37 的方法,其中 α 4 整联蛋白亚基来源于人。

39. 权利要求 38 的方法,其中所述配体来源于人。

40. 权利要求 36 的方法,其中第二整联蛋白亚基是 α E 整联蛋白亚基,

而且其中配体是E-钙粘着蛋白。

41. 权利要求 40的方法, 其中 α E整联蛋白亚基来源于人。

42. 权利要求 41的方法, 其中所述配体来源于人。

43. 权利要求 36 的方法, 其中所述抑制能减少或减轻疾病症状, 所述疾病选自由炎症、哮喘、炎症性肠病、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、糖尿病、器官移植造成的炎症、移植体抗宿主的疾病、和同种异体移植疾病相关的炎症所组成的组。

44. 在哺乳动物所受疾病中调节 β 7 整联蛋白介导的细胞粘附和/或募集的方法, 其通过向哺乳动物给予有效量的组合物来进行, 所述组合物含权利要求 2 的多肽或抗体和药物载体。

45. 权利要求 44 的方法, 其中疾病选自由炎症、哮喘、炎症性肠病、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、糖尿病、器官移植造成的炎症、移植体抗宿主的疾病、和同种异体移植疾病相关的炎症所组成的组。

46. 权利要求 44 的方法, 其中哺乳动物是人。

47. 权利要求 44 的方法, 其进一步包括给予第二生物药剂或化学治疗剂。

48. 权利要求 44 的方法, 其中所述调节能抑制 β 7 整联蛋白同 α 4 整联蛋白、 α E 整联蛋白、MAdCam、VCAM、E-钙粘着蛋白、和/或纤连蛋白的相互作用。

49. 组合物, 其含根据权利要求 1、2、5、26 或 34 之任一的抗- β 7 结合多肽、抗体、或其结合片段和药物载体。

50. 制品, 其包括组合物和标明该组合物所用于治疗疾病方法的标签, 所述组合物含根据权利要求 1、2、5、26 或 34 之任一的抗- β 7 结合多肽、抗体、或其结合片段和药物载体, 其中疾病选自由炎症、哮喘、炎症性肠病、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、糖尿病、器官移植造成的炎症、移植体抗宿主的疾病、和同种异体移植疾病相关的炎症所组成的组。

人源化的抗- $\beta 7$ 拮抗剂及其应用

本文是根据 37 CFR § 1.53(b)(1)提交的非临时申请, 要求依照 35 U.S.C. § 119(e)享有 2004 年 9 月 3 日提交的美国临时申请第 60/607,377 号的优先权, 其全文纳入本文参考。

技术领域

本发明主要涉及分子生物学和生长因子调节调控领域。更具体而言, 本发明涉及调节含 $\beta 7$ 亚基的整联蛋白生物活性的调节因子, 以及所述调节因子的应用。

背景

整联蛋白 (integrin) 是 α/β 异二聚化的细胞表面受体, 其参与从细胞粘着到基因调节的众多细胞过程 (Hynes, R.O., Cell, 1992, 69: 11-25; 和 Hemler, M.E., Annu. Rev. Immunol., 1990, 8: 365-368)。几种整联蛋白与疾病进程有联系, 它们作为用于发现药物的潜在靶位而引起了广泛的兴趣 (Sharar, S.R.等, Springer Semin. Immunopathol., 1995, 16: 359-378)。免疫系统中, 整联蛋白与炎性过程中的白细胞运动、粘附和浸润有关 (Nakajima, H.等, J. Exp. Med., 1994, 179: 1145-1154)。整联蛋白的差异表达调节了细胞粘附性质, 而且不同整联蛋白与不同炎症反应有关。Butcher, E.C.等, Science, 1996, 272: 60-66。 $\beta 7$ 整联蛋白 (即 $\alpha 4\beta 7$ ($\alpha 4\beta 7$ 和 $\alpha E\beta 7$ ($\alpha E\beta 7$)) 主要在单核细胞、淋巴细胞、嗜曙红细胞、嗜碱性细胞、和巨噬细胞上表达, 而不在嗜中性粒细胞上表达。Elices, M.J.等, Cell, 1990, 60: 577-584。针对 $\alpha 4\beta 7$ 整联蛋白的主要配体是内皮表面蛋白粘膜地址素细胞粘着分子 (mucosal addressin cell adhesion molecular, MAdCAM) 和血管细胞粘着分子 (VCAM-1) (Makarem, R.等, J. Biol. Chem., 1994, 269: 4005-4011)。 $\alpha 4\beta 7$ 同炎症部位中的高内皮小静脉 (HEV) 上表达的 MAdCAM 和/或 VCAM 的结合, 会造成白细胞牢牢粘附到内皮上, 然后外渗入炎症的组织中 (Chuluyan, H.E.等, Springer Semin. Immunopathol., 1995, 16:

391-404)。针对 α E β 7整联蛋白的主要配体是上皮内淋巴细胞 (intra-epithelial lymphocyte, IEL) 表面蛋白, E-钙粘着蛋白(E-cadherin), 其辅助含 α E β 7的细胞牢牢粘附到上皮淋巴细胞上。抗 α 4 β 7、MAdCAM 或 VCAM 的单克隆抗体在慢性炎症的动物模型中已显示出是有效的调节因子, 如哮喘 (Laberge, S.等, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1995, 151: 822-829.)、类风湿性关节炎(RA; Barbadillo, C.等, Springer Semin. Immunopathol., 1995, 16: 375-379)、结肠炎 (Viney 等, J. Immunol., 1996, 157: 2488-2497)和炎症性肠病 (IBD; Podalski, D.K., N. Eng. J. Med., 1991, 325: 928-937; Powrie, F.等, Ther. Immunol., 1995, 2: 115-123)。抗 β 7亚基的单克隆抗体已显示出能结合整联蛋白亚基 (Tidswell, M.等 (1997) J. Immunol. 159: 1497-1505), 但由于是非人或非人源化抗体, 它们缺少临床效用。

需要有高度特异性化合物, 如人源化抗体或其结合片段, 其能抑制 α 4 β 7整联蛋白和其配体MAdCAM和/或VCAM间的相互作用以及 α E β 7整联蛋白和其配体 E-钙粘着蛋白间的相互作用。这些化合物可用于治疗慢性炎症, 如哮喘、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、糖尿病、器官移植的并发症、和与同种移植相关的病症。

本文中引用的所有参考文献, 包括专利申请和公开出版物, 它们的全文都纳入参考。

发明内容

本发明部分是基于鉴定含 β 7的整联蛋白所涉及的生物学途径的各种拮抗剂, 其通常是显现出重要而有益的治疗靶位的生物/细胞过程。这些生物学途径包括而不限于, 炎症, 尤其是慢性炎症疾病, 如哮喘, 过敏, IBD, 糖尿病, 移植和移植体抗宿主的疾病。本发明提供了基于干扰 β 7整联蛋白介导的细胞粘附和/或募集的组合物和方法, 包括但不限于干扰 MAdCAM 和 VCAM-1 结合 α 4 β 7整联蛋白细胞外部分以及E-钙粘着蛋白同 α E β 7整联蛋白相互作用。本发明的拮抗剂, 如本文所述, 其提供了重要的治疗和诊断剂, 用于靶向与经异常或不需要的 β 7整联蛋白信号传递相关的病理状况。因此, 本发明提供了与调节 β 7整联蛋白介导途径相关的方法、组合物、试剂盒和制品, 包括调节 MAdCAM- α 4 β 7同肠胃上皮细胞的结合以及白细胞募集、结合和过敏、哮喘、IBD (如克罗恩氏病(Crohn's disease)和溃疡性结

肠炎)、糖尿病、与移植相关的炎症、移植体抗宿主的疾病和/或同种异体移植疾病和其它由 $\beta 7$ 整联蛋白介导的生物/生理活性。

在一个方面,本发明提供了抗- $\beta 7$ 治疗剂,其适于治疗用途并能影响改变 $\beta 7$ 整联蛋白介导途径的阻断程度。例如,在一个具体实施方式中,本发明提供了人源化的抗- $\beta 7$ 抗体,其中Fab片段形式的抗体具有基本等同于小鼠Fab片段的人 $\beta 7$ 结合亲和力,所述小鼠Fab片段包括如图1A和1B或图9A和9B所述的轻链和重链可变结构域序列,或由或基本由如图1A和1B或图9A和9B所述的轻链和重链可变结构域序列组成。在另一个具体实施方式中,本发明提供了人源化的抗- $\beta 7$ 抗体,其中Fab片段形式的抗体具有较低的人 $\beta 7$ 结合亲和力,例如较小鼠或大鼠Fab片段低至少3、至少5、至少7或至少10倍,所述小鼠或大鼠Fab片段包括如图1A和1B所述的轻链和重链可变结构域序列或如图9A和9B所述的可变结构域序列,或由或基本由如图1A和1B所述的轻链和重链可变结构域序列或如图9A和9B所述的可变结构域序列组成。可选地,本发明的人源化抗- $\beta 7$ 抗体、或其 $\beta 7$ 结合片段,显示出有与人 $\beta 7$ 的单价亲和力,所述亲和力基本等于或大于抗体对于人 $\beta 7$ 的单价亲和力,所述抗体含如图1A (SEQ ID NO: 10)和/或图1B (SEQ ID NO: 11)、或图9A (SEQ ID NO: 12)和/或图9B (SEQ ID NO: 13)所述的轻链和重链可变序列。抗体或其结合片段具有与人 $\beta 7$ 的强亲和力,其大于含有图1A (SEQ ID NO: 10)和/或图1B (SEQ ID NO: 11)、或图9A (SEQ ID NO: 12)和/或图9B (SEQ ID NO: 13)所述的轻链和重链序列的抗体至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍、至少5000倍、或至少10,000倍。

在另一个具体实施方式中,本发明提供了抗- $\beta 7$ 人源化抗体,其中Fab片段形式的抗体具有较高的人 $\beta 7$ 结合亲和力,例如较啮齿动物(大鼠或小鼠)Fab片段的高例如至少3、至少5、至少7、至少9、至少10、至少15、至少20、或至少100倍,所述啮齿动物Fab片段分别包含如图1A和图1B所述的轻链和重链可变结构域序列,或由或基本由如图1A和图1B所述的轻链和重链可变结构域序列组成。在一个具体实施方式中,所述啮齿动物Fab片段具有含大鼠抗体可变结构域序列的Fab片段的结合亲和性,所述大鼠抗体命名为FIB504.64,由保藏于美国典型培养物保藏中心的登录号为ATCC HB-293的杂交瘤细胞系产生。在更进一步的具体实施方式中,本发

明的人源化 Fab 片段具有含抗体可变结构域序列的 Fab 片段的结合亲和力，所述抗体由本发明的人源化抗-β7 抗体之任一所产生。作为已经成熟的技术，利用各种测试能够确定配体同其受体的结合亲和力，并以各种定量数值表示。因此，在一个具体实施方式中，结合亲和力用 Kd 值表示，反映了内在的结合亲和力 (如，具有最小化亲合力的效应)。通常并且优选在体外测量结合亲和力，测量可以在无细胞或与细胞相关的条件下进行。如本文所更详细描述，结合亲和力的倍数差异能用 Fab 形式的人源化抗体的结合亲和力值与参照/比较 Fab 抗体(如，具有供体高变区序列的小鼠抗体)的结合亲和力值的比率来量化，其中结合亲和力值在相似的测试条件下测定。因而，在一个具体实施方式中，结合亲和力的倍数差异定为 Fab 形式的人源化抗体与所述参照/比较 Fab 抗体的 Kd 值的比率。现有已知的大量测试，包括本文所述的那些，都能用来实现结合亲和力的测量，包括如，Biacore® (Biacore International Ab, Uppsala, 瑞典)和 ELISA。

在其各个方面和具体实施方式中，本发明的 β7 拮抗剂抗体直接表示为以下本申请可能的权利要求的集合：包括抗-β7 抗体或其 β7 结合片段的抗体，其包含：

(a) 至少一、二、三、四、或五个高变区 (HVR)序列，其选自下列所组成的组：

(i) HVR-L1，其含序列 A1-A11，其中 A1-A11 为 RASESVDTYLH (SEQ ID NO: 1)

(ii) HVR-L2，其含序列 B1-B8，其中 B1-B8 为 KYASQSIG (SEQ ID NO: 2)

(iii) HVR-L3，其含序列 C1-C10，其中 C1-C10 为 QQGNSLLPNT (SEQ ID NO: 3)

(iv)HVR-H1，其含序列 D1-D10，其中 D1-D10 为 GFFITNNYWG (SEQ ID NO: 4)

(v) HVR-H2 ， 其 含 序 列 E1-E17 ， 其 中 E1-E17 为 GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 5)； 和

(vi)HVR-H3，其含序列 F2-F11，其中 F2-F11 为 MTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 6)。

在权利要求 1 的多肽或抗体的具体实施方式中，多肽或抗体包含至少

一个变体 HVR，其中该变体 HVR 包含 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8 和 9 所述序列之至少一个序列的至少一个残基的修饰。在权利要求 1 或权利要求 2 的另一个具体实施方式中，本发明包括抗-β7 抗体或其 β7 结合片段，其包含一、二、三、四、五或六个高变区 (HVR)，所述高变区选自由 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3 组成的组，其中：

(i)HVR-L1，其含氨基酸序列 RASESVDTYLH (SEQ ID NO: 1)；RASESVDSLH (SEQ ID NO: 7)、RASESVDTLH (SEQ ID NO: 8)、或 RASESVDDLH (SEQ ID NO: 9)；

(ii) HVR-L2，其含氨基酸序列 KYASQSIG (SEQ ID NO: 2)、RYASQSIG (SEQ ID NO: 67、或 XYASQSIG (SEQ ID NO: 68，其中 X 表示任意氨基酸)，

(iii) HVR-L3，其含氨基酸序列 QQGNSLPNT (SEQ ID NO: 3)，

(iv) HVR-H1，其含氨基酸序列 GFFITNNYWG (SEQ ID NO: 4)，

(v) HVR-H2，其含氨基酸序列 GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 5)，和

(vi) HVR-H3，其含氨基酸序列 MTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 6)或对应于第 F2 -F11 位的 RTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 66)；或含氨基酸序列 F1-F11，其中 F1-F11 为 AMTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 63)、ARTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 64)、或 AQTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 65)。

在权利要求 1 或任何具体实施方式的另一个具体实施方式中，本发明包括抗-β7 抗体或其 β7 结合片段，其包含一、二、三、四、五或六个高变区 (HVR)，所述高变区选自由 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3 组成的组，其中：

(i)HVR-L1，其含氨基酸序列 A1-A11，其中 A1-A11 为 RASESVDTYLH (SEQ ID NO: 1)；RASESVDSLH (SEQ ID NO: 7)、RASESVDTLH (SEQ ID NO: 8)、或 RASESVDDLH (SEQ ID NO: 9)或 SEQ ID NO: 1、7、8 或 9 的变体，所述变体中氨基酸 A2 选自由 A、G、S、T、和 V 组成的组，和/或氨基酸 A3 选自由 S、G、I、K、N、P、Q、R、和 T 组成的组，和/或 A4 选自由 E、V、Q、A、D、G、H、I、K、L、N、和 R 组成的组，和/或氨基酸 A5 选自由 S、Y、A、D、G、H、I、K、N、P、R、T、和 V 组成的组，和/或氨基酸 A6 选自由 V、R、I、A、G、K、L、M、和 Q 组成

的组, 和/或氨基酸 A7 选自由 D、V、S、A、E、G、H、I、K、L、N、P、S、和 T 组成的组, 和/或氨基酸 A8 选自由 D、G、N、E、T、P 和 S 组成的组, 和/或氨基酸 A9 选自由 L、Y、I 和 M 组成的组, 和/或氨基酸 A10 选自由 L、A、I、M、和 V 组成的组, 和/或氨基酸 A11 选自由 H、Y、F、和 S 组成的组;

(ii) HVR-L2, 其含氨基酸序列 B1-B8, 其中 B1-B8 为 KYASQSSIS (SEQ ID NO: 2)、RYASQSSIS (SEQ ID NO: 67)、或 XYASQSSIS (SEQ ID NO: 68, 其中 X 表示任意氨基酸) 或 SEQ ID NO: 2、67 或 68 的变体; 所述变体中氨基酸 B1 选自由 K、R、N、V、A、F、Q、H、P、I、L、Y 和 X (其中 X 表示任意氨基酸) 组成的组, 和/或氨基酸 B4 选自由 S 和 D 组成的组, 和/或氨基酸 B5 选自由 Q 和 S 组成的组, 和/或氨基酸 B6 选自由 S、D、L、和 R 组成的组, 和/或氨基酸 B7 选自由 I、V、E、和 K 组成的组;

(iii) HVR-L3, 其含氨基酸序列 C1-C9, 其中 C1-C9 为 QQGNLSPNT (SEQ ID NO: 3) 或 SEQ ID NO: 3 的变体, 所述变体中氨基酸 C8 选自由 N、V、W、Y、R、S、T、A、F、H、I、L、M、和 Y 组成的组;

(iv) HVR-H1, 其含氨基酸序列 D1-D10, 其中 D1-D10 为 GFFITNNYWG (SEQ ID NO: 4);

(v) HVR-H2, 其含氨基酸序列 E1-E17, 其中 E1-E17 为 GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 5)、或 SEQ ID NO: 5 的变体, 所述变体中氨基酸 E2 选自由 Y、F、V、和 D 组成的组, 和/或氨基酸 E6 选自由 S 和 G 组成的组, 和/或氨基酸 E10 选自由 S 和 Y 组成的组, 和/或氨基酸 E12 选自由 N、T、A、和 D 组成的组, 和/或氨基酸 E13 选自由 P、H、D、和 A 组成的组, 和/或氨基酸 E15 选自由 L 和 V 组成的组, 和/或氨基酸 E17 选自由 S 和 G 组成的组; 和

(vi) HVR-H3, 其含氨基酸序列 F2-F11, 其中 F2 -F11 为 MTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 6) 或 RTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 66); 或含氨基酸序列 F1-F11, 其中 F1-F11 为 AMTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 63)、ARTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 64)、或 AQTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 65), 或含 SEQ ID NO: 6、63、64、65、或 66 的变体, 所述变体中氨基酸 F2 为 R、M、A、E、G、Q、S, 和/或氨基酸 F11 选自由 F 和 Y 组成的组。

在权利要求 1 或本发明的任何抗体的一个具体实施方式中, 重链框架

第 71 位上的氨基酸(根据 Kabat 编号系统) 选自由 R、A、和 T 组成的组, 和/或重链框架第 73 位上的氨基酸 (Kabat 编号系统) 选自由 N 和 T 组成的组, 和/或重链框架第 78 位上的氨基酸 (Kabat 编号系统) 选自由 F、A、和 L 组成的组。

在权利要求 1 或本发明的任何抗体的一个具体实施方式中, 本发明抗体的 HVR-L1 含 SEQ ID NO: 1 序列。在一个具体实施方式中, 本发明抗体的 HVR-L2 含 SEQ ID NO: 2 序列。在一个具体实施方式中, 本发明抗体的 HVR-L3 含 SEQ ID NO: 3 序列。在一个具体实施方式中, 本发明抗体的 HVR-H1 含 SEQ ID NO: 4 序列。在一个具体实施方式中, 本发明抗体的 HVR-H2 含 SEQ ID NO: 5 序列。在一个具体实施方式中, 本发明抗体的 HVR-H3 在对应的第 F2-F11 位上含 SEQ ID NO: 6 或 66 序列, 或在对应的第 F1-F11 位上含 SEQ ID NO: 63、64、或 65。在一个具体实施方式中, HVR-L1 含 RASESVDSLH (SEQ ID NO: 7)。在一个具体实施方式中, HVR-L1 含 RASESVDTLLH (SEQ ID NO: 8)。在一个具体实施方式中, HVR-L1 含 RASESVDDLH (SEQ ID NO: 9)。在一个具体实施方式中, 本发明含这些序列 (在本文中所述的序列的组合) 的抗体是人源化的或人的。

在一个方面, 本发明提供了含一、二、三、四、五或六个 HVR 的抗体, 其中每个 HVR 包含选自由 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8 和 9 组成的组的序列, 或由或基本由选自由 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8 和 9 组成的组的序列组成, 而且其中 SEQ ID NO: 1、7、8 或 9 对应于 HVR-L1, SEQ ID NO: 2 对应于 HVR-L2, SEQ ID NO: 3 对应于 HVR-L3, SEQ ID NO: 4 对应于 HVR-H1, SEQ ID NO: 5 对应于 HVR-H2, 和 SEQ ID NO: 6 对应于 HVR-H3。在一个具体实施方式中, 本发明的抗体含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3, 其中每个依次含 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5 和 6。在一个具体实施方式中, 本发明的抗体含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3, 其中每个依次含 SEQ ID NO: 7、2、3、4、5 和 6。在一个具体实施方式中, 本发明的抗体含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3, 其中每个依次含 SEQ ID NO: 8、2、3、4、5 和 6。在一个具体实施方式中, 本发明的抗体含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3, 其中每个依次含 SEQ ID NO: 9、2、3、4、5 和 6。在一个具体实施方式中, 本发明的抗体含 HVR-L1、

HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3，其中每个依次含 SEQ ID NO: 9、2、3、4、5 和 66，或含 SEQ ID NO: 9、2、3、4、5、63 或 SEQ ID NO: 9、2、3、4、5、64 或 SEQ ID NO: 9、2、3、4、5、和 65 或 SEQ ID NO: 9、67、3、4、5、64 或 SEQ ID NO: 9、68、3、4、5、64。

本发明抗体的 HVR 变体可在 HVR 中有一个或多个残基修饰，而且 HVR 和/或框架区域可以是人源化的。本发明带有 HVR 和/或框架区修饰的具体实施方式包括而限于以下本申请可能的权利要求：

2. 权利要求 1 或其任何具体实施方式的抗体，其中变体 HVR-L1 中的 A8 是 S、D 或 T，而且 A9 是 L。

3. 权利要求 1 或其任何具体实施方式的抗体，其中抗体是人源化的。

4. 权利要求 1 或其任何具体实施方式的抗体，其中至少一部分框架序列是人共有框架序列。

5. 权利要求 1 或其任何具体实施方式的抗体，其中所述修饰是替换、插入或缺失。

6. 权利要求 1 或其任何具体实施方式的抗体，其中 HVR-L1 变体在以下任意组合的位置上含 1-10 (1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10) 个替换：A2 (A、G、S、T、或 V)；A3 (S、G、I、K、N、P、Q、R、或 T)、A4 (E、A、D、G、H、I、K、L、N、Q、R、或 V)、A5 (S、A、D、G、H、I、K、N、P、R、T、V、或 Y)、A6 (V、A、G、I、K、L、M、Q、或 R)、A7 (D、A、E、G、H、I、K、L、N、P、S、T、或 V)、A8 (S、D、E、G、P、T 或 N)、A9 (L、Y、I、或 M)、A10 (L、A、I、M、或 V)、和 A11 (H、F、S、或 Y)。

7. 权利要求 1 或其任何具体实施方式的抗体，其中其中 HVR-L2 变体在以下任意组合的位置上含 1-4 (1、2、3、或 4) 个替换：B1 (K、R、N、V、A、F、Q、H、P、I、L、Y、T、H、S、E、C、D、G、或 M)、B5 (Q 或 S)、B6 (S、R 或 L)、和 B7 (I、T、E、K、或 V)。

8. 权利要求 1 或其任何具体实施方式的抗体，其中 HVR-L3 变体在 C8 位置上含至少一个替换(W、Y、R、S、A、F、H、I、L、M、N、T、或 V)。

9. 权利要求 1 或其任何具体实施方式的抗体，其中 HVR-H2 变体在以下任意组合的位置上含 1-7 (1、2、3、4、5、6、或 7) 个替换：E2 (V、D、或 F)、E6 (G)、E10 (Y)、E12 (A、D、或 T)、E13 (D、A、或 H)、E15 (V)、

E17 (G)。

10. 权利要求 1 或其任何具体实施方式的抗体，其中 HVR-H3 变体在以下任意组合的位置上含 1 或 2 个替换：F2 (A、E、G、Q、R、或 S)、和 F11 (Y)。

11. 权利要求 1 或其任何具体实施方式的抗体，其含具有 SEQ ID NO: 7 序列的 HVR-L1。

12. 权利要求 1 或其任何具体实施方式的抗体，其含具有 SEQ ID NO: 8 序列的 HVR-L1。

13. 权利要求 1 或其任何具体实施方式的抗体，其含具有 SEQ ID NO: 9 序列的 HVR-L1。

14. 权利要求 11-13 之任一的抗体，其含重链人亚型 III 重链共有框架序列，其在第 71、73 和/或 78 位上包含替换。

15. 权利要求 14 的抗体，其中替换是 R71A、N73T 或 N78A。

16. 权利要求 1 或其任何具体实施方式的抗体，其含具有 SEQ ID NO: 3 序列的 HVR-L3。

17. 权利要求 1 或其任何具体实施方式的抗体，其中变体 HVR-L1 中的 A8 为 S。

18. 权利要求 1 或其任何具体实施方式的抗体，其中变体 HVR-L1 中的 A8 为 D。

19. 权利要求 1 或其任何具体实施方式的抗体，其中变体 HVR-L1 中的 A9 为 L。

20. 权利要求 1 或其任何具体实施方式的抗体，其中在序列 E1-E17 和 F1-F11 之间的框架序列是 HFR3-1-HFR3-31，并且其中 HFR3-6 是 A 或 R，HFR3-8 是 N 或 T，而且 HFR3-13 是 L 或 A 或 F。

21. 人源化抗-β7 抗体，其中抗体对于人 β7 的单价亲和力基本等于含有如图 9 所述轻链和重链可变序列的大鼠抗体的单价亲和力。

22. 人源化抗-β7 抗体，其中抗体对于人 β7 的单价亲和力大于含有如图 9 所述轻链和重链可变序列的大鼠抗体的单价亲和力至少 3 倍。

23. 权利要求 21 或 22 的人源化抗体，其中大鼠抗体由美国典型培养物保藏中心保藏的登录号为 ATCC HB-293 的杂交瘤细胞系产生。

24. 权利要求 21-23 任一项的抗体，其中结合亲和力以 Kd 值表示。

25. 权利要求 21-24 任一项的抗体，其中结合亲和力由 Biacore™或放射免疫测试来测定。

26. 权利要求 1 的抗体，其含人 κ 亚型 1 轻链共有框架序列。

27. 权利要求 1 的抗体，其含重链人亚型 III 重链共有框架序列。

28. 权利要求 27 的抗体，其中框架序列包含在第 71、73 和/或 78 位上的替换。

29. 权利要求 28 的抗体，其中所述替换是 R71A、N73T 和/或 N78A，或其中在第 71 位上替换的氨基酸是 R 或 A，和/或在第 78 位上的氨基酸替换是 N 或 T，和/或在第 78 位上的氨基酸替换是 L 或 A 或 F。

30. 权利要求 28 的抗体，其中所述替换是 L78F 或 A78F 或 A78L 或 L78A。

31. 抑制人 β 7 整联蛋白亚基同第二整联蛋白亚基和/或配体相互作用的方法，其通过将权利要求 1-30 之任一的抗体与所述第二整联蛋白和/或所述配体接触来进行。

32. 权利要求 31 的方法，其中所述第二整联蛋白亚基是 α 4 整联蛋白亚基，而且其中所述配体是 MAdCAM、VCAM 或纤连蛋白。

33. 权利要求 32 的方法，其中 α 4 整联蛋白亚基是人的。

34. 权利要求 33 的方法，其中配体是人的。

35. 权利要求 32 的方法，其中第二整联蛋白亚基是 α E 整联蛋白亚基，而且其中所述配体是 E-钙粘着蛋白。

36. 权利要求 35 的方法，其中 α E 整联蛋白亚基是人的。

37. 权利要求 36 的方法，其中配体是人的。

38. 权利要求 31 的方法，其中所述抑制能减少或减轻疾病症状，所述疾病选自由炎症、哮喘、炎症性肠病(inflammatory bowel disease)、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、糖尿病、器官移植造成的炎症、移植体抗宿主的疾病、和同种异体移植疾病相关的炎症(inflammation associated with allograft disorder)所组成的组。

本发明进一步的具体实施方式包括而限于下列：

在一个具体实施方式中，HVR-L1 是 SEQ ID NO: 1、7、8、或 9 或 SEQ ID NO: 1、7、8 或 9 的 HVR-L1 变体，所述变体在对应的第 A1-A11 位中以下任意组合的位置上含 1-10 (1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10) 个替

换: A2 (A、G、S、T、或V); A3 (S、G、I、K、N、P、Q、R、或T)、A4 (E、A、D、G、H、I、K、L、N、Q、R、或V)、A5 (S、A、D、G、H、I、K、N、P、R、T、V、或Y)、A6 (V、A、G、I、K、L、M、Q、或R)、A7 (D、A、E、G、H、I、K、L、N、P、S、T、或V)、A8 (T、S、D、E、G、P、T或N)、A9 (Y、L、Y、I、或M)、A10 (L、A、I、M、或V)、和A11 (H、F、S、或Y)。在一个具体实施方式中, HVR-L2是 SEQ ID NO: 2、67、或68或SEQ ID NO: 2、67、或68的HVR-L2变体, 所述HVR-L2变体在对应的第B1-B8位中以下任意组合的位置上含1-4(1、2、3、4、4或5)个替换: B1(K、R、N、V、A、F、Q、H、P、I、L、Y或X(其中X表示任意氨基酸)、B4(S)、B5(Q或S)、B6(S、R或L)、和B7(I、T、E、K、或V)。在一个具体实施方式中, HVR-L3是SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 3的HVR-L3变体, 所述变体在对应的第C1-C8位上含至少一个替换, 如在C8位(W、Y、R、S、A、F、H、I、L、M、N、T、或V)。在一个具体实施方式中, HVR-H1是SEQ ID NO: 4。在一个具体实施方式中, HVR-H2是SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 5的HVR-H2变体, 所述HVR-H2变体在对应的E1-E17位中以下任意组合的位置上含1-7(1、2、3、4、5、6、或7)个替换: E2(Y、V、D、或F)、E6(S或G)、E10(S或Y)、E12(N、A、D、或T)、E13(P、D、A、或H)、E15(L或V)、E17(S或G)。在一个具体实施方式中, HVR-H3是SEQ ID NO: 6、63、64、65、或66或SEQ ID NO: 6、63、64、65、或66的HVR-H3变体, 所述变体在SEQ ID NO: 63、64、和65所对应的第F1-F11位中或在SEQ ID NO: 6和66所对应的第F2-F11位中的以下任意组合的位置上含1或2替换: F2(M、A、E、G、Q、R、或S)、和F11(F或Y)。每个位置后括号中的字母直观地表明了将氨基酸替换(即置换)为共有的或其它的氨基酸, 这对于所属领域技术人员来说是显然的, 本文上下文中所述的其它氨基酸作为替换氨基酸的适宜程度能利用现有已知和/或本文所述的技术常规进行评估。

在一个具体实施方式中, HVR-L1含SEQ ID NO: 1序列。在一个具体实施方式中, 变体HVR-L1的A8是D。在一个具体实施方式中, 变体HVR-L1的A8是S。在一个具体实施方式中, 变体HVR-L1的A9是L。在一个具体实施方式中, 变体HVR-L1的A8是D, 而且变体HVR-L1的A9是L。在一个具体实施方式中, 变体HVR-L1的A8是S, 而且变体

HVR-L1 的 A9 是 L。在本发明的具体实施方式中, 包括在 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2 和 HVR-H3 中的变化, 所述 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2 和 HVR-H3 依次包含 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和 6, 或依次由或基本由 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和 6 组成。在一些具体实施方式中, HVR-H3 包含(在对应的第 F2-F11 位上的)SEQ ID NO: 6 或 66 或(在对应的第 F1-F11 位上的)SEQ ID NO: 63 或 64 或 65, 或由或基本由(在对应的第 F2-F11 位上的)SEQ ID NO: 6 或 66 或(在对应的第 F1-F11 位上的)SEQ ID NO: 63 或 64 或 65 组成。

在一个具体实施方式中, 变体 HVR-L1 的 A8 是 I, 而且变体 HVR-L1 的 A9 是 L, 所述变体进一步含 HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3, 每个 HVR 依次包含 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和 6, 或依次由或基本由 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和 6 组成。

在一个具体实施方式中, 变体 HVR-L1 的 A8、A9、和 A10 分别是 D、L、和 V, 所述变体进一步含 HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3, 每个 HVR 依次包含 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和 6, 或依次由或基本由 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和 6 组成。

在一个具体实施方式中, 变体 HVR-L1 的 A8 和 A9 分别是 N 和 L, 所述变体进一步含 HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3, 每个 HVR 依次包含 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和 6, 或依次由或基本由 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和 6 组成。

在一个具体实施方式中, 变体 HVR-L1 的 A8 和 A9 分别是 P 和 L, 而且变体 HVR-L2 的 B6 和 B7 分别是 R 和 T, 所述变体进一步含 HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3, 每个 HVR 依次包含 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和 6, 或依次由或基本由 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和 6 组成。

在一个具体实施方式中, 变体 HVR-L1 的 A2、A4、A8、A9、和 A10 分别是 S、D、S、L、和 V, 所述变体进一步含 HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3, 每个 HVR 依次包含 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和 6, 或依次由或基本由 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和 6 组成。

在一个具体实施方式中, 变体 HVR-L1 的 A5 和 A9 分别是 D 和 T, 所述变体进一步含 HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3, 每个 HVR 依次包含 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和 6, 或依次由或基本由 SEQ

ID NO: 2、3、4、5、和6组成。

在一个具体实施方式中，变体 HVR-L1 的 A5 和 A9 分别是 N 和 L，所述变体进一步含 HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3，每个 HVR 依次包含 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和6，或依次由或基本由 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和6组成。

在一个具体实施方式中，变体 HVR-L1 的 A9 是 L，所述变体进一步含 HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3，每个 HVR 依次包含 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和6，或依次由或基本由 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和6组成。

在一个具体实施方式中，本发明的抗体或抗- β 7 结合多肽含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3，每个 HVR 依次包含 SEQ ID NO: 9、2、3、4、5、和64，或依次由或基本由 SEQ ID NO: 9、2、3、4、5、和64组成。在另一个具体实施方式中，每个 HVR 依次包含 SEQ ID NO: 9、67、3、4、5、和64，或依次由或基本由 SEQ ID NO: 9、67、3、4、5、和64组成。在另一个具体实施方式中，每个 HVR 依次包含 SEQ ID NO: 9、68、3、4、5、和64，或依次由或基本由 SEQ ID NO: 9、68、3、4、5、和64组成。在另一个具体实施方式中，每个 HVR 依次包含 SEQ ID NO: 9、2 或 67 或 68、3、4、5、和66，或依次由或基本由 SEQ ID NO: 9、2 或 67 或 68、3、4、5、和66组成。

在一些具体实施方式中，所述变体 HVR-L1 的抗体变体进一步含 HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3，其中每个依次含 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和6所述的序列。当抗体变体含 HVR-L1 A8(P)和 A9(L)和 HVR-L2 B6(R)和 B7(T)时，在一些具体实施方式中，所述 HVR-L1、HVR-L2 变体进一步含 HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、和 HVR-H3，其中每个依次含 SEQ ID NO: 3、4、5、和6所述的序列。

在一些具体实施方式中，这些抗体进一步包含人亚型 III 重链框架共有序列。在这些抗体的一个具体实施方式中，框架共有序列在第 71、73 和/或 78 位上含有替换。在这些抗体的一些具体实施方式中，第 71 位是 A，73 位是 T 和/或 78 位是 A。在这些抗体的一个具体实施方式中，这些抗体进一步包含人 κ I 轻链框架共有序列。

在一个具体实施方式中，本发明的抗体含有 HVR-L1，其包含 SEQ ID

NO: 1。在一个具体实施方式中,本发明的变体抗体含变体 HVR-L1,其中 A10 是 V。在一个具体实施方式中,所述变体抗体进一步含 HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2 和 HVR-H3,其中每个依次含 SEQ ID NO: 2、3、4、5 和 6 所述的序列。在一些具体实施方式中,这些抗体进一步含人亚型 III 重链框架共有序列。在这些抗体的一个具体实施方式中,框架共有序列在第 71、73 和/或 78 位上含有替换。在这些抗体的一些具体实施方式中,第 71 位是 A,第 73 位是 T 和/或第 78 位是 A。在这些抗体的一个具体实施方式中,这些抗体进一步含人 κI 轻链框架共有序列。

在一个具体实施方式中,本发明的抗体含 HVR-L3,其包含 SEQ ID NO: 3。在一个具体实施方式中,本发明的变体抗体含变体 HVR-L3,其中 C8 是 L。在一个具体实施方式中,所述变体抗体进一步含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-H1、HVR-H2 和 HVR-H3,其中每个依次含 SEQ ID NO: 1、2、4、5 和 6 所述的序列。在一个具体实施方式中,本发明的抗体含变体 HVR-L3,其中 C8 是 W。在一个具体实施方式中,所述变体抗体进一步含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-H1、HVR-H2 和 HVR-H3,其中每个依次含 SEQ ID NO: 1、2、4、5 和 6 所述的序列。在一些具体实施方式中,HVR-L1 含 SEQ ID NO: 7、8、或 9。在一些具体实施方式中,这些抗体进一步含人亚型 III 重链框架共有序列。在这些抗体的一个具体实施方式中,框架共有序列在第 71、73 和/或 78 上含有替换。在这些抗体的一些具体实施方式中,第 71 位是 A,第 73 位是 T 和/或第 78 位是 A。在这些抗体的一个具体实施方式中,这些抗体进一步含人 κI 轻链框架共有序列。

在一个具体实施方式中,本发明的抗体含 HVR-H3,其包含 SEQ ID NO: 6。在一个具体实施方式中,所述抗体变体含变体 HVR-H3,其中 F1 是 Q。在一个具体实施方式中,所述变体抗体进一步含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1 和 HVR-H2,其中每个依次含 SEQ ID NO: 1、2、3、4、和 5 所述的序列。在一个具体实施方式中,本发明的抗体含变体 HVR-H3,其中 F1 是 R。在一个具体实施方式中,所述变体抗体进一步含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1 和 HVR-H2,其中每个依次含 SEQ ID NO: 1、2、3、4、和 5 所述的序列。在一个具体实施方式中,HVR-L1 含 SEQ ID NO: 7、8、或 9。在一些具体实施方式中,这些抗体进一步含人亚型 III 重链框架共有序列。在这些抗体的一个具体实施方式中,框架共有序列在第 71、

73 和/或 78 上含有替换。在这些抗体的一些具体实施方式中，第 71 位是 A，第 73 位是 T 和/或第 78 位是 A。在这些抗体的一个具体实施方式中，这些抗体进一步含人 κI 轻链框架共有序列。

在一个具体实施方式中，本发明的抗体含 HVR-L1，其包含 SEQ ID NO: 1。在一个具体实施方式中，抗体含变体 HVR-L1，其中 A4 是 Q。在一个具体实施方式中，所述变体抗体进一步含 HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2 和 HVR-H3，其中每个依次含 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和 6 所述的序列。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含变体 HVR-L1，其中 A6 是 I。在一个具体实施方式中，所述变体抗体进一步含 HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2 和 HVR-H3，其中每个依次含 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和 6 所述的序列。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含变体 HVR-L1，其中 A7 是 S。在一个具体实施方式中，所述变体抗体进一步含 HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2 和 HVR-H3，其中每个依次含 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和 6 所述的序列。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含变体 HVR-L1，其中 A8 是 D 或 N。在一个具体实施方式中，所述变体抗体进一步含 HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2 和 HVR-H3，其中每个依次含 SEQ ID NO: 2、3、4、5、和 6 所述的序列。在一些具体实施方式中，这些抗体进一步含人亚型 III 重链框架共有序列。在这些抗体的一个具体实施方式中，框架共有序列在第 71、73 和/或 78 上含有替换。在这些抗体的一些具体实施方式中，第 71 位是 A，第 73 位是 T 和/或第 78 位是 A。在这些抗体的一个具体实施方式中，这些抗体进一步含人 κI 轻链框架共有序列。

在一个具体实施方式中，本发明的抗体含 HVR-L2，其包含 SEQ ID NO: 2。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含变体 HVR-L2，其中 B1 是 N。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含变体 HVR-L2，其中 B5 是 S。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含变体 HVR-L2，其中 B6 是 L。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含变体 HVR-L2，其中 B7 是 V。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含变体 HVR-L2，其中 B7 是 E 或 K。在一些具体实施方式中，所述变体抗体进一步含 HVR-L1、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2 和 HVR-H3，其中每个依次含 SEQ ID NO: 1、3、4、5、和 6 所述的序列。在一些具体实施方式中，HVR-L1 含 SEQ ID NO: 7、8、

或 9。在一些具体实施方式中，这些抗体进一步含人亚型 III 重链框架共有序列。在这些抗体的一个具体实施方式中，框架共有序列在第 71、73 和/或 78 上含有替换。在这些抗体的一些具体实施方式中，第 71 位是 A，第 73 位是 T 和/或第 78 位是 A。在这些抗体的一个具体实施方式中，这些抗体进一步含人 κI 轻链框架共有序列。

在一个具体实施方式中，本发明的抗体含 HVR-L3，其含 SEQ ID NO: 3。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含变体 HVR-L3 其中 C8 是 W、Y、R、或 S。在一些具体实施方式中，所述变体抗体进一步含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-H1、HVR-H2 和 HVR-H3，其中每个依次含 SEQ ID NO: 1、2、4、5、和 6 所述的序列。在一些具体实施方式中 HVR-L1 含 SEQ ID NO: 7、8、或 9。在一些具体实施方式中，这些抗体进一步含人亚型 III 重链框架共有序列。在这些抗体的一个具体实施方式中，框架共有序列在第 71、73 和/或 78 上含有替换。在这些抗体的一些具体实施方式中，第 71 位是 A，第 73 位是 T 和/或第 78 位是 A。在这些抗体的一个具体实施方式中，这些抗体进一步含人 κI 轻链框架共有序列。

在一个具体实施方式中，本发明的抗体含 HVR-H2，其含 SEQ ID NO: 5。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含变体 HVR-H2，其中 E2 是 F。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含变体 HVR-H2，其中 E2 是 V 或 D。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含变体 HVR-H2，其中 E6 是 G。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含变体 HVR-H2，其中 E10 是 Y。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含变体 HVR-H2，其中 E12 是 A、D、或 T。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含变体 HVR-H2，其中 E13 是 D、A、或 N。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含变体 HVR-H2，其中 E15 是 V。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含变体 HVR-H2，其中 E17 是 G。在一些具体实施方式中，所述变体抗体进一步含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1 和 HVR-H3，其中每个依次含 SEQ ID NO: 1、2、3、4、和 6 所述的序列。在一些具体实施方式中，HVR-L1 含 SEQ ID NO: 7、8、或 9。在一些具体实施方式中，这些抗体进一步含人亚型 III 重链框架共有序列。在这些抗体的一个具体实施方式中，框架共有序列在第 71、73 和/或 78 上含有替换。在这些抗体的一些具体实施方式中，第 71 位是 A，第 73 位是 T 和/或第 78 位是 A。在这些抗体的一个具体实施方式中，这些

抗体进一步含人 κ I 轻链框架共有序列。

在一个具体实施方式中，本发明的抗体含 HVR-H3，其含 SEQ ID NO: 6。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含变体 HVR-H3，其中 F11 含 Y。在一些具体实施方式中，所述变体 抗体进一步含 HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1 和 HVR-H3，其中每个依次含 SEQ ID NO: 1、2、3、4、和 6 所述的序列。在一些具体实施方式中，HVR-L1 含 SEQ ID NO: 7、8、或 9。在一些具体实施方式中，这些抗体进一步含人亚型 III 重链框架共有序列。在这些抗体的一个具体实施方式中，框架共有序列在第 71、73 和/或 78 上含有替换。在这些抗体的一些具体实施方式中，第 71 位是 A，第 73 位是 T 和/或第 78 位是 A。在这些抗体的一个具体实施方式中，这些抗体进一步含人 κ I 轻链框架共有序列。

在一些具体实施方式中，这些抗体进一步含人亚型 III 重链框架共有序列。在这些抗体的一个具体实施方式中，框架共有序列在第 71、73 和/或 78 上含有替换。在这些抗体的一些具体实施方式中，第 71 位是 A，第 73 位是 T 和/或第 78 位是 A。在这些抗体的一个具体实施方式中，这些抗体进一步含人 κ I 轻链框架共有序列。

用于宿主受试者的治疗剂优选在所述受试者内引发很小以至不引发针对试剂的免疫应答。在一个具体实施方式中，本发明提供了这样的试剂。例如，在一个具体实施方式中，本发明提供了人源化抗体，其在宿主受试者内，相对于含 SEQ ID NO: 10 和/或 11 (图 1A 和 1B) 或 SEQ ID NO: 12 和/或 13 (图 9A 和 9B 描述的大鼠抗-小鼠 Fib504 氨基酸序列) 序列的抗体，引发和/或预期引发人抗-啮齿动物抗体的应答(如抗-小鼠或抗-大鼠应答)或人抗-人应答的水平充分降低。在另一个例子中，本发明提供了人源化抗体，其不引发和/或预期不引发人抗-啮齿动物 (如人抗-小鼠 (HAMA) 或人抗-大鼠) 或人抗-人抗体的应答 (HAHA)。

本发明的人源化抗体可以在其重和/或轻链可变结构域中包含一个或多个个人和/或人共有非高变区(如，框架)序列。在一些具体实施方式中，有一个或多个额外的修饰存在于人和/或人共有非高变区序列中。在一个具体实施方式中，本发明抗体的重链可变结构域含人共有框架序列，在一个具体实施方式中其为亚型 III 共有框架序列。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含有在至少一个氨基酸位置上经修饰的变体亚型 III 共有框架序列。例

如, 在一个具体实施方式中, 变体亚型 III 共有框架序列可在第 71、73、78 和/或 94 位中的一个或多个位置上含有替换。在一个具体实施方式中, 所述替换是可任意组合的 R71A、N73T、L78A、和/或 R94M。

由于是现有已知的并且将在下文中更详细地描述, 因此根据上下文和现有已知的各种定义 (如下所述), 描述抗体高变区的氨基酸位置/范围可以变化。可变结构域内的一些位置可视作杂合(hybrid)高变位, 因此这些位置在一套标准下可被认为处于高变区内, 而在另一套标准下可被认为处于高变区外。在(如下文所进一步定义的)延伸的高变区中, 也可发现这些位置中的一个或多个位置。本发明提供了在这些杂合高变位中含有修饰的抗体。在一个具体实施方式中, 这些杂合高变位包括重链可变结构域中第 26-30、33-35B、47-49、49、57-65、93、94 和 102 位中的一个或多个位置。在一个具体实施方式中, 这些杂合高变位包括轻链可变结构域中第 24-29、35-36、46-49、49、56 和 97 位中的一个或多个位置。在一个具体实施方式中, 本发明的抗体包含在一个或多个杂合高变位上经修饰的变体人亚型共有框架序列。在一个具体实施方式中, 本发明的抗体含重链可变结构域包含在第 28-35、49、50、52a、53、54、58-61、63、65、94 和 102 位中一个或多个位置上经修饰的变体人亚型 III 共有框架序列。在一个具体实施方式中, 抗体含有 T28F、F29I、S30T、S31N、Y32N、A33Y、M34W、和 S35G 替换。在一个具体实施方式中, 抗体含 S49G 替换。在一个具体实施方式中, 抗体含 V50F 或 V50D 或 V50Y 替换。在一个具体实施方式中, 抗体含 G53Y 替换。在一个具体实施方式中, 抗体含 G54S 替换。在一个具体实施方式中, 抗体含 Y58S 替换。在一个具体实施方式中, 抗体含 A60N 或 A60D 或 A60T 替换。在一个具体实施方式中, 抗体含 D61P 或 D61A 或 D61H 替换。在一个具体实施方式中, 抗体含 V63L 替换。在一个具体实施方式中, 抗体含 G65S 替换。在一个具体实施方式中, 抗体含 R94M 替换。在一个具体实施方式中, 抗体含 R94A 或 R94E 或 R94G 或 R94Q 或 R94S 替换。在一个具体实施方式中, 抗体含 G95T 替换。在一个具体实施方式中, 抗体在第 28-35、49、50、52a、53、54、58-61、63、65、94 和 102 位上含一个或多个替换, 并进一步在位置 R71A 或 N73T 或 L78A 或 L78F 上含一个或多个替换。在一个具体实施方式中, 抗体含 Y102F 替换。参照图 1B 可以看出, 这些替换在重链的 HVR-H1、HVR-H2、和/或 HVR-H3 中。

在一个具体实施方式中，本发明的抗体含轻链可变结构域，其包含在第 27、29-31、33、34、49、50、53-55、91 和 96 位中的一个或多个位置上经修饰的变体人亚型 I 共有框架序列。在一个具体实施方式中，抗体含 Q27E 替换。在一个具体实施方式中，抗体含 I29V 替换。在一个具体实施方式中，抗体含 S30D 替换。在一个具体实施方式中，抗体含 N31T 或 N31S 或 N31D 替换。在一个具体实施方式中，抗体含 Y32L。在一个具体实施方式中，抗体含 A34H 替换。在一个具体实施方式中，抗体含 Y49K 替换。在一个具体实施方式中，抗体含 A50Y 替换。在一个具体实施方式中，抗体含 S53Q 替换。在一个具体实施方式中，抗体含 L54S 替换。在一个具体实施方式中，抗体含 E55I 或 E55V 替换。在一个具体实施方式中，抗体含 Y91G 替换。在一个具体实施方式中，抗体含 W96N 或 W96L 替换。在一个具体实施方式中，抗体含 A25S 替换。在一个具体实施方式中，抗体含 A25 替换为 G、S、T、或 V 的替换。在一个具体实施方式中，抗体包含修饰，所述修饰选自以下替换组中一个或多个。例如，在一个具体实施方式中，抗体含 S26 替换为 G、I、K、N、P、Q、或 T 的替换。在一个具体实施方式中，抗体含 Q27 替换为 E、A、D、G、H、I、K、L、N、Q、R、或 V 的替换。在一个具体实施方式中，抗体含 S28 替换为 A、D、G、H、I、K、N、P、R、T、V、或 Y 的替换。在一个具体实施方式中，抗体含 I29 替换为 V、A、G、K、L、M、Q 或 R 的替换。在一个具体实施方式中，抗体含 S30 替换为 D、A、E、G、H、I、K、L、N、P、S、T 或 V 的替换。在一个具体实施方式中，抗体含 N31 替换为 D、T、E、或 G 的替换。在一个具体实施方式中，抗体含 Y32 替换为 L、I 或 M 的替换。在一个具体实施方式中，抗体含 L33 替换为 A、I、M 或 V 的替换。在一个具体实施方式中，抗体含 A34 替换为 H、F、Y 或 S 的替换。在一个具体实施方式中，抗体含 Y49 替换为 K 或 N 替换。在一个具体实施方式中，抗体含 A50Y 替换。在一个具体实施方式中，抗体含 S53Q 替换。在一个具体实施方式中，抗体含 L54S 替换。在一个具体实施方式中，抗体含 E55 替换为 V、I 或 K 替换。在一个具体实施方式中，抗体含 Y91G 替换。在一个具体实施方式中，抗体含 W96 替换为 N、L、W、Y、R、S、A、F、H、I、M、N、R、S、T、V 或 Y 的替换。参照图 1A 可以看出，这些替换在轻链的 HVR-L1、HVR-L2、和/或 HVR-L3 中。

如果抗体显示出所需的生物特性(如,所需的结合亲和性),则本发明的抗体可含任何合适的人轻链框架序列或人共有轻链框架序列。在一个具体实施方式中,本发明的抗体含至少一部分(或全部)人 κ 轻链的框架序列。在一个具体实施方式中,本发明的抗体含至少一部分(或全部)人 κ 亚型 I 框架共有序列。

在一个具体实施方式中,如果轻链第 49 位和重链第 94 位包含在延伸的 HVR 中,并且如果所述第 49 位是 K,而且所述第 94 位优选但不必须是 M 并可以是 R,则本发明的抗体含重和/或轻链可变结构域,其含 SEQ ID NO: 34-41 所述的并处在图 1、7 和 8 中的框架序列。

本发明的拮抗剂可用于调节一个或多个方面的 $\beta 7$ 相关效应,包括但不限于与 $\alpha 4$ 整联蛋白亚基的结合、与 αE 整联蛋白亚基的结合、将 $\alpha 4\beta 7$ 整联蛋白结合于 MAdCAM、VCAM-1 或纤连蛋白和将 $\alpha E\beta 7$ 整联蛋白结合于 E-钙粘着蛋白。这些效应可通过生物学相关机理来调节,包括阻断配体结合于 $\beta 7$ 亚基或结合于 $\alpha 4\beta 7$ 或 $\alpha E\beta 7$ 二聚整联蛋白,和/或通过阻断 α 和 β 整联蛋白亚基之间的结合,由此抑制二聚整联蛋白的形成。因此,在一个具体实施方式中,本发明提供了 $\beta 7$ 拮抗剂抗体,其抑制 $\alpha 4$ 结合于 $\beta 7$ 。在一个具体实施方式中,本发明的 $\beta 7$ 拮抗剂抗体阻断 $\alpha 4\beta 7$ 同 MAdCAM 的结合。在一个具体实施方式中,本发明的 $\beta 7$ 拮抗剂抗体阻断 $\alpha 4\beta 7$ 同 VCAM-1 的结合。在一个具体实施方式中,本发明的 $\beta 7$ 拮抗剂抗体阻断 $\alpha 4\beta 7$ 同纤连蛋白的结合。在一个具体实施方式中,本发明的 $\beta 7$ 拮抗剂抗体阻断 $\beta 7$ 同 αE 的结合。在一个具体实施方式中,本发明的 $\beta 7$ 拮抗剂抗体阻断 $\alpha 4\beta 7$ 整联蛋白同 E-钙粘着蛋白的结合。干扰可以是直接或间接的。例如, $\beta 7$ 拮抗剂抗体可以结合到 $\alpha 4\beta 7$ 或 $\alpha E\beta 7$ 二聚区域序列内的 $\beta 7$ 上,由此抑制整联蛋白亚基的相互作用和整联蛋白二聚体的形成。在进一步的例子中, $\beta 7$ 拮抗剂抗体可以结合到 $\beta 7$ 亚基配体结合结构域内的序列上,由此抑制所述结合结构域同其结合配偶体(如对于 $\alpha 4\beta 7$ 整联蛋白来说,有纤连蛋白、VCAM、和/或 MAdCAM; 或对于 $\alpha E\beta 7$ 整联蛋白来说,有 E-钙粘着蛋白)的相互作用。在另一个例子中, $\beta 7$ 拮抗剂抗体可以结合到不在整联蛋白亚基二聚化结构域或配体结合结构域内的序列上,但是其中所述 $\beta 7$ 拮抗剂抗体的结合会导致能阻断 $\beta 7$ 结构域同其结合配偶体(如 $\alpha 4$ 或 αE 整联蛋白亚基和/或配体,如纤连蛋白、VCAM、MAdCAM、或 E-钙粘着蛋白)的相互作用。

在一个具体实施方式中，本发明的拮抗剂抗体同 $\beta 7$ (例如，细胞外结构域) 结合，由此阻断 $\beta 7$ 同 $\alpha 4$ 或 αE 亚基的二聚化。在一个具体实施方式中，本发明的拮抗剂抗体同 $\beta 7$ 结合，由此能够阻断 $\beta 7$ 和/或 $\alpha 4\beta 7$ 和/或 $\alpha E\beta 7$ 整联蛋白同其各自配体或多个配体的结合。例如，在一个具体实施方式中，本发明提供了拮抗剂抗体，其同 $\beta 7$ 分子的结合抑制了所述分子的二聚化。在一个具体实施方式中，本发明的 $\beta 7$ 拮抗剂抗体特异结合 $\beta 7$ 配体结合结构域中的序列。在一个具体实施方式中，本发明的 $\beta 7$ 拮抗剂抗体特异结合 $\beta 7$ 配体结合结构域中的序列，由此阻断配体(即，纤连蛋白、VCAM、和/或 MAdCAM)结合于 $\alpha 4\beta 7$ 整联蛋白上。在一个具体实施方式中，本发明的 $\beta 7$ 拮抗剂抗体特异结合 $\beta 7$ 配体结合结构域中的序列，由此阻断配体(即，E-钙粘着蛋白)结合于 $\alpha E\beta 7$ 整联蛋白上。

在一个具体实施方式中，本发明的拮抗剂抗体阻断 $\beta 7$ 二聚化，包括异二聚化(即， $\beta 7$ 同 $\alpha 4$ 或 αE 整联蛋白亚基分子的二聚化)。

在一个具体实施方式中，本发明的拮抗剂抗体结合 $\beta 7$ 整联蛋白亚基上的表位，所述亚基对应于氨基酸 176-237。在另一个具体实施方式中，本发明的拮抗剂抗体结合 $\beta 7$ 整联蛋白上相同的表位，该表位与 Fib504.64 (ATCC HB-293) 的表位基本相同。通过标准技术可确定表位结合，所述技术包括而不仅限于竞争性结合分析。

在一个方面，本发明提供了抗体，其包含一、二、三、四、五个或所有图 13 氨基酸替换表所述的 HVR 序列的组合。

用于宿主受试者的治疗剂优选在所述受试者内引发很小以至不引发针对试剂的免疫应答。在一个具体实施方式中，本发明提供了这样的试剂。例如，在一个具体实施方式中，本发明提供了人源化抗体，其在宿主受试者内，相对于含 SEQ ID NO: 10、11、12 和/或 SEQ ID NO: 13 (大鼠抗-小鼠 Fib504 (ATCC HB-293)，图 1 和 9) 序列的抗体，在充分降低了的水平上引发和/或预期引发人抗-大鼠或人抗-小鼠或人抗-人抗体应答。在另一个例子中，本发明提供了人源化抗体，其不引发和/或预期不引发人抗-小鼠、人抗-大鼠或人抗-人抗体的应答。

本发明的人源化抗体可以在其重和/或轻链可变结构域中包含一个或多个个人和/或人共有非高变区(如，框架)序列。在一些具体实施方式中，有一个或多个额外的修饰存在于人和/或人共有非高变区序列中。在一个具体实

实施方式中，本发明抗体的重链可变结构域含人共有框架序列，在一个具体实施方式中其为亚型 III 共有框架序列。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含有在至少一个氨基酸位置上经修饰的变体亚型 III 共有框架序列。例如，在一个具体实施方式中，尽管第 94 位是本发明延伸的重链高变区-H3 的一部分，但是变体亚型 III 共有框架序列可在第 71、73、78 和/或 94 位中的一个或多个位置上含有替换。在一个具体实施方式中，所述替换是可任意组合的 R71A、N73T、L78A、和/或 R94M。

如果抗体显示出所需的生物特性(如，所需的结合亲和力)，则本发明的抗体可含任何合适的人或人共有轻链框架序列。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含至少一部分(或全部) 人 κ 轻链的框架序列。在一个具体实施方式中，本发明的抗体含至少一部分(或全部)人 κ 亚型 I 框架共有序列。

本发明的拮抗剂可用于调节一个或多个方面的 $\beta 7$ 相关效应。例如， $\beta 7$ 拮抗剂抗体可以结合到 $\alpha 4\beta 7$ 或 $\alpha E\beta 7$ 二聚区域序列内的 $\beta 7$ 上，由此抑制整联蛋白亚基的相互作用和整联蛋白二聚体的形成。在进一步的例子中， $\beta 7$ 拮抗剂抗体可以结合到 $\beta 7$ 亚基配体结合结构域内的序列上，由此抑制所述结合结构域同其结合配偶体(如对于 $\alpha 4\beta 7$ 整联蛋白来说，有纤连蛋白、VCAM、和/或 MAdCAM; 或对于 $\alpha E\beta 7$ 整联蛋白来说，有 E-钙粘着蛋白)的相互作用。在另一个例子中， $\beta 7$ 拮抗剂抗体可以结合到不在整联蛋白亚基二聚化结构域或配体结合结构域内的序列上，但是其中所述 $\beta 7$ 拮抗剂抗体的结合会导致能阻断 $\beta 7$ 结构域同其结合配偶体(如 $\alpha 4$ 或 αE 整联蛋白亚基和/或配体，如纤连蛋白、VCAM、MAdCAM、或 E-钙粘着蛋白)的相互作用。在一个具体实施方式中，本发明的拮抗剂抗体同 $\beta 7$ (例如，细胞外结构域)结合，由此阻断 $\beta 7$ 同 $\alpha 4$ 或 αE 亚基的二聚化。在一个具体实施方式中，本发明的拮抗剂抗体同 $\beta 7$ 结合，由此能够阻断 $\beta 7$ 和/或 $\alpha 4\beta 7$ 和/或 $\alpha E\beta 7$ 整联蛋白同其各自配体或多个配体的结合。例如，在一个具体实施方式中，本发明提供了拮抗剂抗体，其同 $\beta 7$ 分子的结合抑制了所述分子的二聚化。在一个具体实施方式中，本发明的 $\beta 7$ 拮抗剂抗体特异结合 $\beta 7$ 配体结合结构域中的序列。在一个具体实施方式中，本发明的 $\beta 7$ 拮抗剂抗体特异结合 $\beta 7$ 配体结合结构域中的序列，由此阻断配体(即，纤连蛋白、VCAM、和/或 MAdCAM)结合于 $\alpha 4\beta 7$ 整联蛋白上。在一个具体实施方式中，本发明的 $\beta 7$ 拮抗剂抗体特异结合 $\beta 7$ 配体结合结构域中的序列，由此阻断配体(即，

E-钙粘着蛋白) 结合于 $\alpha\beta 7$ 整联蛋白上。

在一个具体实施方式中, 本发明的拮抗剂抗体阻断 $\beta 7$ 二聚化, 包括异二聚化 (即, $\beta 7$ 同 $\alpha 4$ 或 αE 整联蛋白亚基分子的二聚化)。

在一些情况下, 有 $\beta 7$ 拮抗剂抗体是有益的, 所述 $\beta 7$ 拮抗剂抗体不干扰配体 (如纤连蛋白、VCAM、MAdCAM、或 αE) 同以整联蛋白一部分形式的 $\beta 7$ 亚基结合或同以二聚体形式的 $\alpha 4\beta 7$ 整联蛋白或 $\alpha E\beta 7$ 整联蛋白结合。因此, 在一个具体实施方式中, 本发明提供了抗体, 其不结合 $\beta 7$ 上的纤连蛋白、VCAM、MAdCAM、或 E-钙粘着蛋白的结合位点, 但取而代之的, 抑制 $\beta 7$ 亚基和 α 亚基 (如 $\alpha 4$ 或 αE 整联蛋白亚基) 之间的相互作用, 由此阻止形成有生物学活性的整联蛋白。在一个实例中, 本发明的拮抗剂抗体可用于偶联一个或多个其它拮抗剂, 其中所述拮抗剂靶向于 $\beta 7$ 整联蛋白轴内的不同过程和/或功能。因而, 在一个具体实施方式中, 本发明的 $\beta 7$ 拮抗剂抗体结合 $\beta 7$ 上的表位, 其不同于其它 $\beta 7$ 或 α/β 整联蛋白拮抗剂 (如 $\alpha 4\beta 7$ 抗体, 包括单克隆抗体或抗体, 例如衍生自和/或与衍生自小鼠抗体的抗体具有相同或基本上相同的结合特性或特异性的人源化抗体或单克隆抗体) 所结合的表位。

在一个具体实施方式中, 本发明提供了 $\beta 7$ 拮抗剂抗体, 其阻断 $\beta 7$ - $\alpha 4$ 或 αE 与各自整联蛋白的多聚化及配体结合。例如, 本发明抑制 $\beta 7$ 同 $\alpha 4$ 或 αE 整联蛋白亚基二聚化的拮抗剂抗体可以进一步包括同结合 $\beta 7$ 或整联蛋白二聚体的配体 (如, 它可以干扰纤连蛋白、VCAM、和/或 MAdCAM 同 $\beta 7$ 和/或 $\alpha 4\beta 7$ 的结合; 或它可以干扰 E-钙粘着蛋白同 $\beta 7$ 或 $\alpha E\beta 7$ 的结合) 竞争的能力。

在本发明 $\beta 7$ 拮抗剂抗体的一个具体实施方式中, 拮抗剂同 $\beta 7$ 的结合抑制由配体结合所活化的细胞粘附。在本发明 $\beta 7$ 拮抗剂抗体的另一个具体实施方式中, 拮抗剂同 $\beta 7$ 在细胞中的结合抑制细胞往表达含 $\beta 7$ 的整联蛋白的细胞和/或组织中募集。

在一个具体实施方式中, 本发明的 $\beta 7$ 拮抗剂抗体特异结合 $\beta 7$ 细胞外结构域的至少一部分氨基酸 176-250 (可任选氨基酸 176-237) (参见 Tidswell, M. 等 (1997) J. Immunol. 159: 1497-1505) 或其变体, 并减少或阻断配体 MAdCAM、VCAM-1、纤连蛋白、和/或 E-钙粘着蛋白的结合。在一个具体实施方式中, 这种配体结合的阻断可阻断、减少和/或阻止表达配体

的细胞同表达含 $\beta 7$ 配体的细胞的粘附。在一个具体实施方式中，本发明的拮抗剂抗体特异结合含残基 176-237 的 $\beta 7$ 氨基酸序列。在一个具体实施方式中，本发明的拮抗剂抗体特异结合构象表位，所述表位由选自 $\beta 7$ 的残基 176-237 所组成的组中至少一个序列的部分或全部形成。在一个具体实施方式中，本发明的拮抗剂抗体特异结合具有与人 $\beta 7$ 的残基 176-237 或残基 176-250 的氨基酸序列至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99% 序列同一性或相似性的氨基酸序列。在一个具体实施方式中，本发明的拮抗剂抗- $\beta 7$ 抗体结合与抗- $\beta 7$ 抗体 Fib504 相同的表位，所述抗- $\beta 7$ 抗体 Fib504 由杂交瘤 ATCC HB-293 产生。

在一个方面，本发明提供了组合物，其包含本发明的一个或多个拮抗剂抗体和载体。在一个具体实施方式中，载体是药学上可接受的。

在一个方面，本发明提供了核酸，其编码本发明的 $\beta 7$ 拮抗剂抗体。

在一个方面，本发明提供了载体，其包含本发明的核酸。

在一个方面，本发明提供了宿主细胞，其包含本发明的核酸或载体。载体可以是任何类型的，例如重组载体，如表达载体。可使用各种宿主细胞。在一个具体实施方式中，宿主细胞是原核细胞，例如，大肠杆菌。在一个具体实施方式中，宿主细胞是真核细胞，例如哺乳动物细胞，如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

在一个方面，本发明提供了制备本发明拮抗剂的方法。例如，本发明提供了制备 $\beta 7$ 拮抗剂抗体(其如本文所定义的，包括全长和其片段)的方法，所述方法包括在合适的宿主细胞中表达本发明的编码所述抗体(或其片段)的重组载体，并收获所述抗体。

在一个方面，本发明提供了制品，其包括容器；和包含在容器中的组合物，其中组合物含本发明的一个或多个 $\beta 7$ 拮抗剂抗体。在一个具体实施方式中，所述组合物含本发明的核酸。在一个具体实施方式中，含拮抗剂抗体的组合物进一步含载体，在一些具体实施方式中它是药学上可接受的。在一个具体实施方式中，本发明的制品进一步含将组合物(例如，拮抗剂抗体)向受试者给药的说明书。

在一个方面，本发明提供了试剂盒，其包括含组合物的第一容器，所述组合物含本发明的一种或多种 $\beta 7$ 拮抗剂抗体；和含缓冲液的第二容器。在一个具体实施方式中，缓冲液是药学上可接受的。在一个具体实施方式

中，含拮抗剂抗体的组合物进一步含载体，在一些具体实施方式中它是药理学上可接受的。在一个具体实施方式中，试剂盒进一步含将组合物（例如，拮抗剂抗体）向受试者给药的说明书。

$\beta 7$ 整联蛋白和它们的配体在各种疾病状况下表达有差异。[相对于 IBS 对照，在患有炎症性肠病 (UC 和 CD) 的患者中，肠内皮上表达的 MAdCAM-1 在粘膜炎症位点上增加了，而 UC 和 CD 患者的结肠固有层也显示有增加的 CD3⁺和 $\alpha 4\beta 7$ ⁺细胞(参见 Souza H., 等, Gut 45: 856 (1999))。观察到过 MAdCAM-1 的表达与肝病中的门管炎症有关，并在炎症中对 $\alpha 4\beta 7$ ⁺ 淋巴细胞向肝中的募集起重要作用。(Hillan, K., 等, Liver. 19(6): 509-18 (1999)) 肝血管上的 MAdCAM-1 能维持患有 IBD 和原发性硬化性胆管炎的患者们的 $\alpha 4\beta 7$ ⁺淋巴细胞粘附。通过抗-MAdCAM-1、抗- $\alpha 4\beta 7$ ，或抗- $\alpha 4$ 抗体可抑制粘附。(Grant AJ.等, Hepatology. 33(5): 1065-72 (2001))。MAdCAM-1、VCAM-1 和 E-钙粘着蛋白在发炎的中枢神经系统的大脑内皮细胞和/或微血管上表达。 $\beta 7$ 整联蛋白导致 CNS 的脱髓鞘疾病 (Kanwar 等, J. Neuroimmunology 103, 146 (2000))。就 CD 的 LPL 而言， $\alpha 4\beta 7$ 的表达显著高于对照和患有 UC 的患者们的 (Oshitani, N.等, International Journal of Molecule Medicine 12, 715-719 (2003))。CD 患者的 IEL 可以被长期刺激和从外周募集 (Meresse, B., 等, 人 Immunology, 62, 694-700 (2001))。在人肝病中， $\alpha E\beta 7$ T 细胞 (CD4⁺和 CD8⁺) 优先在人肝中积聚，在人肝中，E-钙粘着蛋白在肝细胞和胆管上皮细胞上表达 (Shimizu, Y., 等, Journal of Hepatology 39, 918-924 (2003))。在慢性胰腺炎中，CD8⁺CD103⁺ T 细胞，类似于肠上皮内淋巴细胞，浸润了患慢性胰腺炎的胰腺(Matthias, P., 等, Am J Gastroenterol 93: 2141-2147 (1998))。在具有特异上皮累及的全身性红斑狼疮患者中发现了 $\alpha E\beta 7$ 的上调(Pang 等, Arthritis & Rheumatism 41: 1456-1463 (1998))。在 Sjogren 氏综合症中，CD8⁺ $\alpha E\beta 7$ ⁺ T 细胞粘附并通过诱导凋亡来杀死腺泡上皮细胞 (Kroneld 等, Scand J Rheumatol 27: 215-218, 1998)。整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 和 $\alpha E\beta 7$ 在皮肤炎症期间的 T 细胞外趋皮作用 (epidermotropism) 中起作用，并导致皮肤同种移植排斥 (Sun 等, Transplantation 74, 1202, 2002)。Teraki 和 Shiohara 揭示了 $\alpha E\beta 7$ 整联蛋白会在鳞皮病表皮(psoriatic epidermis)的 CD8⁺ T 细胞上优先表达(Teraki 和 Shiohara, Br. J. Dermatology 147, 1118, 2002)。在哮喘、COPD、和正常个

体中，唾液 T 淋巴细胞是活化的 IEL (CD69+ CD103+) (Leckie 等, Thorax 58, 23, 2003)。在临床肾脏同种移植排斥中，CD103+ (aEb7+) CTL 累积于移植体的上皮细胞上 (Hadley 等, Transplantation 72, 1548, 2001)。因此，在一个方面，本发明提供了本发明的 $\beta 7$ 拮抗剂抗体抑制 $\beta 7$ 整联蛋白-配体相互作用的应用，用以减少或减轻疾病，如一种或多种上述病状。在一个具体实施方式中，本发明的抗体用于制备治疗和/或预防疾病的药物，如炎症，包括而不仅限于炎症性肠病 (如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)、肝炎、CNS 炎症、慢性胰腺炎、系统性红斑狼疮、Sjogren 氏综合症、银屑病(psoriasis) 和皮肤炎症、哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、间质性肺炎、过敏、自身免疫性疾病、移植排斥、肾脏移植体排斥、移植体抗宿主的疾病、糖尿病、和癌症。

在一个方面，本发明提供了本发明的核酸在制备治疗和/或预防疾病的药物中的应用，如免疫(如自身免疫或炎性) 疾病，包括而不仅限于，炎症性肠病 (如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎)和过敏反应 (如呼吸系统、皮肤、关节、过敏性哮喘和其它由含 $\beta 7$ 的整联蛋白介导的过敏反应所影响的器官的疾病)。

在一个方面，本发明提供了本发明的表达载体在制备治疗和/或预防疾病的药物中的应用，如免疫(如自身免疫或炎性) 疾病，包括而不仅限于，炎症性肠病 (如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎)和过敏反应(如呼吸系统、皮肤、关节、和其它由含 $\beta 7$ 的整联蛋白介导的过敏反应所影响的器官的疾病)。

在一个方面，本发明提供了本发明的宿主细胞在制备治疗和/或预防疾病的药物中的应用，如免疫(如自身免疫或炎性) 疾病，包括而不仅限于，炎症性肠病 (如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎)和过敏反应(如呼吸系统、皮肤、关节、和其它由含 $\beta 7$ 的整联蛋白介导的过敏反应所影响的器官的疾病)。

在一个方面，本发明提供了本发明的制品在制备治疗和/或预防疾病的药物中的应用，如免疫(如自身免疫或炎性) 疾病，包括而不仅限于，炎症性肠病 (如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎)和过敏反应(如呼吸系统、皮肤、关节、和其它由含 $\beta 7$ 的整联蛋白介导的过敏反应所影响的器官的疾病)。

在一个方面，本发明提供了本发明的试剂盒在制备治疗和/或预防疾病的药物中的应用，如免疫(如自身免疫或炎性) 疾病，包括而不仅限于，炎症性肠病 (如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎)和过敏反应(如呼吸系统、皮肤、关

节、和其它由含 $\beta 7$ 的整联蛋白介导的过敏反应所影响的器官的疾病)。

本发明提供了方法和组合物,其用于调节与 $\beta 7$ 整联蛋白介导的细胞-细胞相互作用过程失调所相关的病状。 $\beta 7$ 整联蛋白涉及多种生物学和生理学功能,包括如,炎症疾病和过敏反应。因而,在一个方面,本发明提供了方法,其包括向受试者给药本发明的抗体。

在一个方面,本发明提供了抑制 $\beta 7$ 整联蛋白介导的炎症的方法,所述方法包括将细胞或组织同有效量的本发明抗体接触,由此抑制淋巴细胞或 B 细胞同表达 $\beta 7$ 整联蛋白的细胞的相互作用和结合。

在一个方面,本发明提供了治疗受试者中与 $\beta 7$ 整联蛋白结合失调相关的病理状况的方法,所述方法包括向受试者给药有效量的本发明抗体,由此治疗所述状况。

在一个方面,本发明提供了抑制表达 $\beta 7$ 整联蛋白配体的淋巴细胞(如表达 MAdCAM、VCAM、E-钙粘着蛋白或纤连蛋白的细胞)同表达 $\beta 7$ 整联蛋白(如 $\alpha 4\beta 7$ 或 $\alpha E\beta 7$ 整联蛋白)的细胞结合的方法,所述方法包括将所述细胞同本发明的抗体接触,由此抑制或阻止细胞粘附并减轻炎症反应。

在一个方面,本发明提供了治疗或预防与 $\beta 7$ 整联蛋白的增加的表达或活性或者与一种细胞上 $\beta 7$ 整联蛋白和另一种细胞上 $\beta 7$ 整联蛋白受体的增加相互作用所相关的炎症疾病的方法,所述方法包括向需要这种治疗的受试者给药有效量的本发明抗体,由此有效治疗或预防所述炎症疾病。在一个具体实施方式中,所述炎症疾病是炎症性肠病 (IBD)。在另一个具体实施方式中,所述炎症疾病是过敏反应。

本发明的方法可用于影响任何合适的病变,例如,与 $\beta 7$ 整联蛋白结合途径失调相关的细胞和/或组织。 $\beta 7$ 整联蛋白主要是在白细胞上表达 (Tidswell, M.等 (1997) 同上)。在一个具体实施方式中,本发明的方法靶向于白细胞并阻止同表达 $\beta 7$ 整联蛋白配体的细胞结合。例如,根据本发明,通过拮抗剂抗- $\beta 7$ 抗体能阻止表达 E-钙粘着蛋白的上皮内淋巴细胞与表达 $\alpha E\beta 7$ 的细胞结合。通过本发明的拮抗剂抗- $\beta 7$ 抗体能阻止表达 MAdCAM、VCAM-1 或纤连蛋白的细胞与表达 $\alpha 4\beta 7$ 的白细胞结合。

本发明的方法可进一步包括额外的治疗步骤。例如,在一个具体实施方式中,方法可进一步包括这样的步骤,其中靶细胞和/或组织(例如,肠内壁的内皮细胞)暴露于抗-TNF 抗体或小分子治疗剂,其包括而不限于

5-ASA 化合物 (包括而不限于)

如本文所述, $\beta 7$ 整联蛋白介导重要的生物过程, 其失调将导致许多病理状况。因此, 在本发明方法的一个具体实施方式中, 靶细胞 (例如, 内皮细胞) 是这样的细胞, 即相对于缺少了抗本发明 $\beta 7$ 拮抗剂抗体的细胞, 表达 $\beta 7$ 整联蛋白的 $\beta 7$ 整联蛋白配体的细胞(其中细胞可以是并且不限于淋巴细胞, 而配体可以是 MAdCAM、VCAM 或 E-钙粘着蛋白)的粘附被阻断、抑制或阻止了。在一个具体实施方式中, 本发明的方法抑制淋巴细胞归巢 (homing), 由此抑制在 $\beta 7$ 整联蛋白表达位点上的炎症。例如, 与本发明拮抗剂的接触可以使细胞不能粘附到表达 $\beta 7$ 整联蛋白配体的细胞上。

附图简述

图 1A 和 1B 描述了下列可变轻和重链序列的排列: 轻链人亚型 κ I 共有序列(图 1A, SEQ ID NO: 23), 重链人亚型 III 共有序列(图 1B, SEQ ID NO: 24), 大鼠抗-小鼠 $\beta 7$ 抗体(Fib504) 可变轻链 (图 1A, SEQ ID NO: 10), 大鼠抗-小鼠 $\beta 7$ 抗体(Fib504) 可变重链 (图 1B, SEQ ID NO: 11), 和人源化的抗体变体: 人源化 hu504K 移植体可变轻链 (图 1A, SEQ ID NO: 25), 人源化 hu504K 移植体可变重链 (图 1B, SEQ ID NO: 26), 变体 hu504.5 (对于变体 hu504.5、hu504.16、和 hu504.32, 源于人源化 hu504K 移植体的氨基酸变化如图 1A (轻链)和图 1B (重链)所示。在产生 $\beta 7$ 结合抗体的 hu504K 移植体的 HVR-H1 和 HVR-H2 中, 额外氨基酸替换如图 1C 所示。

图 2A 和 2B 描述了人共有亚型 III 序列轻链 (图 2A, SEQ ID NO: 27) 和重链 (图 2B, SEQ ID NO: 28)的全长序列。下划线的是 HVR。

图 3A 和 3B 描述了人源化 504 移植体的全长序列, 其含(如本文所述的)植入人 κ I 共有序列轻链 (图 3A, SEQ ID NO: 29) 和人亚型 III 共有序列重链 (图 3B, SEQ ID NO: 30)的大鼠 Fib504 高变区。下划线的是 HVR。

图 4A 和 4B 描述了人源化 504K 移植体的全长序列, 其中 hu504 移植体轻链的第 49 位是 Y49K 替换。hu504K 移植体轻链如 SEQ ID NO: 31 所述, 而 hu504K 移植体重链如 SEQ ID NO: 30 所述。下划线的是 HVR。

图 5A 和 5B 描述了 hu504K-RF 移植体的全长序列, 其中 hu504 移植体重链第 71 和 78 位是 hu504K 移植体序列的 A71R 替换和 A78F 替换。hu504K-RF 移植体轻链如 SEQ ID NO: 31 所述和 hu504K-RF 移植体重链如

SEQ ID NO: 32 所述。下划线的是 HVR。

图 6A 和 6B 描述了 hu504.32 变体的全长序列，其包含 hu504K-RF 移植体重链 (SEQ ID NO: 32) 和 hu504K 移植体轻链 (SEQ ID NO: 33) 中的 T31D 和 Y32L 替换。下划线的是 HVR。

图 7A-图 7B 和图 8A-图 8B 描述了示例性的受体(acceptor)人共有框架序列，其用于实施本发明，用如下序列标识来表示：

轻链可变区(VL)共有框架 (图 7A、B)

人 VL κ 亚型 I 共有框架 (SEQ ID NO: 14)

人 VL κ 亚型 I 共有框架扣除延伸的 HVR-L2 (SEQ ID NO: 15)

人 VL κ 亚型 II 共有框架 (SEQ ID NO: 16)

人 VL κ 亚型 III 共有框架 (SEQ ID NO: 17)

人 VL κ 亚型 IV 共有框架 (SEQ ID NO: 18)

阴影区域代表轻链 HVR (标示为 L1、L2、和 L3)。

重链可变区 (VH) 共有框架(图 8A、B)

人 VH 亚型 I 共有框架扣除 Kabat CDR (SEQ ID NO: 19)

人 VH 亚型 I 共有框架扣除延伸的高变区(SEQ ID NO: 20-22)

人 VH 亚型 II 共有框架扣除 Kabat CDR (SEQ ID NO: 48)

人 VH 亚型 II 共有框架扣除延伸的高变区 (SEQ ID NO: 49-51)

人 VH 亚型 III 共有框架扣除 Kabat CDR (SEQ ID NO: 52)

人 VH 亚型 III 共有框架扣除延伸的高变区(SEQ ID NO: 53-55)

人 VH 受体(acceptor)框架扣除 Kabat CDR (SEQ ID NO: 56)

人 VH 受体框架扣除延伸的高变区(SEQ ID NO: 57-58)

人 VH 受体 2 框架扣除 Kabat CDR (SEQ ID NO: 59)

人 VH 受体 2 框架扣除延伸的高变区(SEQ ID NO: 60-62)

图 9A 和 9B 描述了由杂交瘤 ATCC HB-293 产生的大鼠抗-小鼠整联蛋白 $\beta 7$ Fib504 抗体可变链的氨基酸序列。下划线的是 HVR。可变轻链如图 9A (SEQ ID NO: 12) 所述，而可变重链如图 9B (SEQ ID NO: 13) 所述。

图 10A 描述了重链各种共有序列(hu 亚型 I-III)中的氨基酸位置。本文实施例描述了用于开发赫赛汀(Herceptin®)，抗-HER2 抗体、大鼠 Fib504、

和 hu504-RL 和 hu504-RF 框架的共有序列。图 10B 是柱状图，其显示了如实施例 1 所述的“RL”或“RF”框架修饰而形成的 $\alpha 4\beta 7$ 同 hu504 移植体抗体和 hu504K 移植体抗体的相对结合。

图 11A -11C. 图 11A 罗列了 HVR 变化，所述 HVR 变化通过提供 hu504.16 变体中的有限范围的氨基酸替换来进行亲和力成熟而得。结果来自于带有如本文实施例 2 所述的 hu504.16 变体中单个的修饰 HVR 文库。框中的氨基酸缩写是 $\beta 7$ 结合抗体 (噬菌体选择的抗体) 中较常见的氨基酸。图 11B 和 11C 是图 11A 中结果的柱状图，显示了通过实施例 2 的突变和选择方法检测到的 hu504.16 变体 (轻链，图 11B; 重链，图 11C) 中氨基酸替换的数量和类型。

图 12 罗列了亲和力成熟的结果，所述亲和力成熟通过提供如实施例 2 所述 hu504.32 变体的 HVR 中的广泛可能的氨基酸替换而进行。阴影框显示了在抗体中最常检测到的氨基酸，所述抗体通过实施例 2 的突变和选择方法被检测为 $\beta 7$ -结合抗体。

图 13 描述了大鼠抗-小鼠 Fib504 (ATCC-293) 以及人共有 (左栏) 的 HVR 序列。通过实施例所述的 (通过软氨基酸随机化 (soft amino acid randomization)、广泛氨基酸替换扫描、和有限氨基酸替换扫描所观察到的氨基酸替换) 测试所观察到的每个 HVR 位置 (并不表示限制性) 的氨基酸替换实例如右边所示, (应用于本发明变体的、将 HVR 人源化修饰的有用方法可在 2004 年 2 月 19 日提交的美国申请第 60/545, 840 号中找到)。

图 14 是示例性的图示，表现了 Fib504 和变体抗体同 MAdCAM 的结合作为如实施例 3 所述的抗体浓度的函数。测定了抗体的 IC_{50} 和 IC_{90} 值。

图 15 描述了与位置有关的 504.32R 抗- $\beta 7$ 抗体的轻和重链 HVR 氨基酸序列，所述位置是根据 Kabat 编号系统和对应于抗体 6 个 HVR 的相对编号系统 (A-F) 而定的。还描述了在重链 FR3 区域第 71、73、和 78 位上的氨基酸。还针对许多 HVR 或重链 FR3 区域中的位置，列出了有用的氨基酸替换。

图 16 显示了柱状图，表示 504.32M 和 504.32R 抗体阻止放射性标记了的 T 细胞归巢到患炎症性肠病的小鼠结肠上的相对能力。

本发明的实施方式

本发明提供了鉴定和/或应用 $\beta 7$ 信号途径的抑制剂的方法、组合物、试剂盒和制品。

本文提供了这些方法、组合物、试剂盒和制品的详情。

常规技术

除非另有说明，本发明的实施将利用分子生物学（包括重组技术）、微生物学、细胞生物学、生物化学、和免疫学的常规技术，它们都在所述领域普通技术的范围内。这些技术在文献中有详细解释，如，“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”，第二版（Sambrook 等，1989）；“Oligonucleotide Synthesis”（M. J. Gait 编，1984）；“Animal Cell Culture”（R. I. Freshney 编，1987）；“Methods in Enzymology”（Academic Press, Inc.）；“Current Protocols in Molecular Biology”（F. M. Ausubel 等编，1987，并定期更新）；“PCR: The Polymerase Chain Reaction”，（Mullis 等编，1994）；“A Practical Guide to Molecular Cloning”（Perbal Bernard V., 1988）；“Phage Display: A Laboratory Manual”（Barbas 等，2001）。

定义

“beta7 亚基”或“ $\beta 7$ 亚基”是指人 $\beta 7$ 整联蛋白亚基（Erle 等，(1991) J. Biol. Chem. 266: 11009-11016）。 $\beta 7$ 亚基与诸如人 $\alpha 4$ 亚基的 $\alpha 4$ 整联蛋白亚基结合（Kilger 和 Holzmann (1995) J. Mol. Biol. 73: 347-354）。 $\alpha 4\beta 7$ 整联蛋白在大多数成熟的淋巴细胞以及少数胸腺细胞、骨髓细胞和肥大细胞上表达。（Kilshaw 和 Murrant (1991) Eur. J. Immunol. 21: 2591-2597；Gurish 等，(1992) 149: 1964-1972；和 Shaw, S.K.和 Brenner, M.B. (1995) Semin. Immunol. 7: 335）。 $\beta 7$ 亚基也与诸如人 αE 整联蛋白亚基的 αE 亚基结合（Cepek, K.L, 等 (1993) J. Immunol. 150: 3459）。 $\alpha E\beta 7$ 整联蛋白在肠内上皮淋巴细胞（iIEL）上表达（Cepek, K.L. (1993)同上）。与本发明的人源化抗- $\beta 7$ 抗体结合的 $\beta 7$ 亚基可以是天然产生的并可以是可溶的或位于细胞表面的。

“alphaE 亚基”或“alphaE 整联蛋白亚基”或“ α 亚基”或“ αE 整联蛋白亚基”或“CD103”是指发现了的与上皮内淋巴细胞（intra-epithelial lymphocyte）上的 $\beta 7$ 整联蛋白结合的整联蛋白亚基，其中 $\alpha E\beta 7$ 整联蛋白介导 iIEL 同表达 E-钙粘着蛋白的肠上皮细胞结合（Cepek, K.L.等 (1993) J. Immunol. 150: 3459；Shaw, S.K.和 Brenner, M.B. (1995) Semin. Immunol. 7: 335）。

“MAdCAM”或“MAdCAM-1”在本发明的上下文中可相互替换使用，指

的是蛋白质粘膜地址素细胞粘着分子-1(protein mucosal addressin cell adhesion molecule -1), 其是包含短胞质尾部、穿膜区域和由三个免疫球蛋白样结构域组成的胞外序列的单链多肽。已经克隆到了鼠、人和猕猴 MAdCAM-1 的 cDNA (Briskin, 等, (1993) Nature, 363: 461-464; Shyjan 等, (1996) J. Immunol. 156: 2851-2857)。

“VCAM-1”或“血管细胞粘着分子-1”、“CD106”指 $\alpha 4\beta 7$ 和 $\alpha 4\beta 1$ 的配体, 其在活化的内皮上表达, 并对内皮-白细胞相互作用(如炎症中的白细胞结合和渗出)起着重要作用。

“E-钙粘着蛋白”指钙粘着蛋白家族的一个成员, 其中 E-钙粘着蛋白在上皮细胞上表达。尽管它在淋巴细胞归巢中的功能不清楚, 但 E-钙粘着蛋白是 $\alpha E\beta 7$ 整联蛋白的配体, 介导表达 $\alpha E\beta 7$ 的 iEL 同肠上皮细胞结合。通过 TGF β 1 可上调 E-钙粘着蛋白的表达。

“纤连蛋白(Fibronectin)”指涉及组织修复、胚形成、血凝固和细胞迁移/粘着的纤连蛋白。它充当 ECM (细胞外基质)中的连接物并以二聚体(血浆纤连蛋白)形式出现在血浆中。肝细胞合成血浆型的, 而成纤维细胞、软骨细胞、内皮细胞、巨噬细胞、以及某些上皮细胞产生 ECM 型的。在本文中, 它同 $\alpha 4\beta 7$ 整联蛋白相互作用, 从而介导淋巴细胞归巢或粘着。通过将细胞锚定到胶原或蛋白聚糖基质上, 纤连蛋白的 ECM 型能用作普通细胞粘着分子。通过同胞外基质的不同成分和同细胞表面上的膜连纤连蛋白受体结合, 纤连蛋白也可和 ECM 一起用于协调细胞的相互作用。最后, 在胚形成期间, 纤连蛋白对细胞迁移事件起着重要作用。

“肠胃炎症疾病”是一组慢性疾病, 其造成粘膜炎症和/或溃疡。这些疾病包括如, 炎症性肠病 (如, 克罗恩氏病, 溃疡性结肠炎, 不明的结肠炎 (indeterminate colitis)和感染性结肠炎(infectious colitis))、粘膜炎 (如, 口腔粘膜炎、肠胃粘膜炎、鼻粘膜炎和直肠炎)、坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis)和食道炎。

“炎症性肠病”或“IBD”在本文中可替换使用, 指造成炎症和/或溃疡的肠疾病, 包括而限于克罗恩氏病和溃疡性结肠炎。

“克罗恩氏病 (CD)”或“溃疡性结肠炎 (UC)”是病因未知的慢性炎症性肠病。克罗恩氏病, 与溃疡性结肠炎不同, 可影响肠的任何部分。克罗恩氏病最显著特征是粒状、红紫色的增厚的肠壁。随着炎症发展, 这些肉芽

肿常常失去它们的界限并与周围组织整合在一起。腹泻和肠梗阻是主要的临床特征。如同溃疡性结肠炎，克罗恩氏病的进程可以是持续的或复发的、轻度的或严重的，但不像溃疡性结肠炎，克罗恩氏病不能通过切除相关肠段来治疗好。大多数患有克罗恩氏病的患者需要在某些情况下进行手术，但将来通常会复发并通常要持续进行医学治疗。

克罗恩氏病可涉及任何部位的消化道，从嘴到肛门，然而它典型地出现在回肠结肠、小肠或结肠-直肠肛门区域。从组织病理学来看，疾病表现有间断的肉芽肿、隐窝脓肿、裂隙和口腔溃疡。伴有炎性浸润，其由淋巴细胞 (T 和 B 细胞)、浆细胞、巨噬细胞、和嗜中性粒细胞形成。在分泌 IgM 和 IgG 的血细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞中有着不成比例的增加。

抗炎药物柳氮磺吡啶(sulfasalazine)和 5-氨基水杨酸(5-aminosalicylic acid, 5-ASA)用于治疗轻微的结肠克罗恩氏病，是常开的药物处方用以持续解除病症。Metroidazole 和环丙沙星(ciprofloxacin)与柳氮磺吡啶有相似的功效，似乎特别对治疗肛周疾病有效。在更严重的病例中，皮质类固醇能有效治疗活动性的(active)病情恶化并甚至能保持疾病症状的减退。咪唑硫嘌呤和 6-巯基嘌呤对需要长期类皮质激素给药的患者也显示出了成效。这些药物也可能可以在长期预防中起作用。不幸的是，在一些患者效果产生前会有非常长的迟滞(迟至 6 个月)。

抗腹泻药物也可在一些患者中带来症状缓解。营养疗法或基本饮食能改善患者的营养状况并促使急性疾病的症状改善，但它不产生持续的临床疾病症状的减退。抗生素用于治疗继发性小肠细菌的生长过度并用于治疗化脓性并发症。

“溃疡性结肠炎 (UC)”累及大肠。疾病过程可以是持续或复发的、轻微或严重的。最早的损伤是炎性浸润，带有隐窝基底形成的脓肿。这些扩大和破裂的隐窝的融合倾向于使上层粘膜失去其血液供给，导致溃疡。疾病症状包括痉挛、下腹痛、直肠出血、和经常性稀便，其中主要包括了血、脓和粘液并缺少排泄物颗粒。对于急性、严重的或慢性、持续的溃疡性结肠炎，需要完全切除结肠。

UC 的临床特征可高度变化，发作会是渐进发展且不明显的，或是突然的，并可包括腹泻、里急后重感并且有反复发作的直肠出血。当爆发性地遍及整个结肠时，可产生中毒性巨结肠，危及生命。肠外的表现形式包括

关节炎、脓皮坏疽(pyoderma gangrenoum)、色素层炎(uveitis)、和结节性红斑。

UC 的治疗, 针对不严重的病例, 包括柳氮磺吡啶和相关的含水杨酸的药物, 并在严重的病例中包括用皮质类固醇药物。局部给药水杨酸盐或皮质类固醇有时有效, 尤其是在疾病限于肠末端, 相对于全身使用, 其能降低副作用。有时需要支持性疗法, 如给药铁和抗腹泻剂。有时也可开咪唑硫嘌呤、6-巯基嘌呤和甲氧蝶呤的处方用在顽固性皮质类固醇依赖病例中。

本文中所用的氨基酸残基/位置“修饰”, 指相对于初始氨基酸序列的一级氨基酸序列变化, 其中变化来自于涉及所述氨基酸残基/位置的序列的改变。例如, 典型的修饰包括用另一个氨基酸替换(如, 保守或非保守替换)(在所述位置上的)残基、在所述残基/位置相邻位上插入一个或多个(一般少于 5 或 3 个)氨基酸、和缺失所述残基/位置。“氨基酸替换”、或其变化, 指在预先确定的(初始)氨基酸序列中, 用不同的氨基酸残基代替现有的氨基酸残基。相对于含初始(或“野生型”)氨基酸序列的多肽, 修饰一般优选会产生变体多肽的至少一种生理生化活性的改变。例如, 对于抗体, 改变的生理生化活性可以是针对靶分子的结合亲和力、结合能力和/或结合效果。

本发明范围内的术语“氨基酸”以最广的含义使用, 其意义包括了天然产生的 L α -氨基酸或残基。本文中使用常用的一和三字母缩写来表示天然产生的氨基酸 (Lehninger, A.L., Biochemistry, 第二版, pp. 71-92, (Worth Publishers, 纽约, 纽约, 1975)。该术语包括 D-氨基酸以及化学修饰的氨基酸, 如氨基酸类似物、不常纳入蛋白质的天然产生的氨基酸(如正亮氨酸)、和具有现有已知氨基酸特有性质的化学合成的化合物。例如, 苯丙氨酸或脯氨酸的类似物或模拟物, 其有与天然 Phe 或 Pro 相同的肽化合物构像限制, 其也包括在氨基酸的定义内。这些类似物和模拟物在本文中被称为氨基酸的“功能等价物”。氨基酸的其它例子列于 Roberts 和 Vellaccio, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Gross 和 Meiehofer 编., 卷 5, p. 341 (Academic Press, Inc., 纽约, 纽约, 1983)中, 其纳入本文参考。当用单字母命名一个天然产生的氨基酸时, 在相关文献中常常可找到这些名称(如参见, Alberts, B.等 Molecular Biology of the Cell, 第三版., Garland Publishing, Inc. 1994, 第 57 页)。

“分离的”抗体是一个抗体，其本身可从其天然环境的成分中被鉴定以及被分离和/或收集。其天然环境的污染成分是干扰抗体诊断或治疗应用的材料，可以包括酶、激素、和其它蛋白质或非蛋白质溶质。在优选的具体实施方式中，抗体将被纯化(1)达到由 Lowry 法确定的大于 95%的抗体重量，并最优选大于 99%重量，(2) 达到足以通过旋杯序列分析仪测得 N-末端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基的程度，或(3) 达到用考马斯亮蓝或优选用银染的 SDS-PAGE 在还原或非还原条件下获得的均一程度。由于不会出现抗体天然环境的至少一种成份，分离的抗体可包括重组细胞内的原位抗体。可是通常，分离的抗体由至少一个纯化步骤来制备。

术语“Kabat 可变结构域残基编号”或“Kabat 氨基酸位置编号”、和其类似称谓，指抗体汇编中的用于重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统，所述抗体汇编为 Kabat 等，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版. 公共卫生服务部, 国家卫生研究院, Bethesda, MD. (1991)。利用该编号系统，对应于截短或插入可变结构域的 FR 或 CDR，实际的线性氨基酸序列可含较少的或额外的氨基酸。例如，重链可变结构域可包括在 H2 的第 52 位残基后插入单个氨基酸 (根据 Kabat 为残基 52a) 并可在重链 FR 残基第 82 位后插入残基(根据 Kabat, 如残基 82a、82b、和 82c 等)。对于特定抗体，残基的 Kabat 编号可通过与“标准”Kabat 编号的序列对抗体序列同源区的配对排列来确定。

本文中所用的短语“基本相似”、或“基本相同”，表示两个数值(一般是与本发明抗体相关的一个和与参照/比较抗体相关的另一个)间足够高的相似性程度，由此所属领域技术人员根据上下文中所述值(如，Kd 值)确定的生物特性，会将两个值之间的差异看作为只有很小或没有生物学和/或统计学意义。作为参照/比较抗体的函数，所述两个值之间的差异优选小于约 50%、优选小于约 40%、优选小于约 30%、优选小于约 20%、优选小于约 10%。

“结合亲和力”一般指分子(如，抗体)和其结合配偶体(例如，抗原)的单个结合位点间非共价相互作用的总力量。除非另外说明，本文中所用的“结合亲和力”指内在结合亲和力，其反映了结合对(如，抗体和抗原)成员间 1: 1 的相互作用。分子 X 与其配偶体 Y 的亲和力一般用解离常数(association constant, Kd)表示。用现有已知的常规方法可测定亲和力，所述方法包括那

些本文中所述的方法。低亲和力抗体一般缓慢结合抗原并倾向于容易解离，而高亲和力抗体一般较快结合抗原并倾向于较长地维持结合。测定结合亲和力的各种方法是现有技术已知的，它们都可为本发明目的使用。以下描述了特定的示例性的具体实施方式：

在一个具体实施方式中，根据本发明的“Kd”或“Kd值”，通过放射性标记的抗原结合测试(RIA)来测定，所述测试用感兴趣的抗体的Fab版本(version)和其抗原来进行，如以下测试所述，在存在未标记抗原连续滴定的情况下，通过用最低浓度的(^{125}I)-标记的抗原平衡Fab，然后用抗-Fab 抗体包被的平板捕获结合的抗原，由此测定了Fab针对抗原的溶液结合亲和力(Chen, 等, (1999) *J. Mol Biol* 293: 865-881)。为了确定测试条件，微滴定板(Dynex)用溶于50 mM 碳酸钠 (pH 9.6)的5 ug/ml捕获抗-Fab抗体(Cappel Labs)包被过夜，然后于室温 (约 23°C)用溶于PBS的2% (w/v) 牛血清白蛋白封闭2至5小时。在未吸附的平板 (Nunc #269620)中，100 pM或26 pM [^{125}I]-抗原 与连续稀释的感兴趣的Fab 相混合(如，等同于Presta等的 (1997) *Cancer Res.* 57: 4593-4599所述的抗-VEGF 抗体、Fab-12评估)。然后孵育感兴趣的Fab 过夜；而孵育可持续较长时间 (如，65 小时)以保证达到平衡。然后，将混合物转移到捕获平板上，于室温孵育(如，一个小时)。然后去除溶液，并用溶于PBS的0.1%吐温-20洗板8次。平板干后，以150ul/孔加入闪烁剂(MicroScint-20; Packard)，并在Topcount γ 计数器(Packard)上对平板计数10分钟。选择能带来小于或等于 20% 最大结合度的每种Fab的浓度，用于竞争结合测试。根据另一个具体实施方式，通过用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)与固定抗原 CM5 芯片于25°C，以~10响应单位(RU)用表面等离子共振测试来测定Kd或Kd值。简而言之，根据供应商的说明书，用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)来活化羧甲基化葡聚糖生物感应芯片(CM5, BIAcore Inc.)。用10mM乙酸钠(pH 4.8)将抗原稀释成5ug/ml (~0.2uM)，然后以 5ul/分钟的流速注入以获得约10响应单位 (RU) 的偶联蛋白质。注入抗原后，注入1M 乙醇胺以封闭未反应的基团。对于动力学测量，于25°C以约 25ul/min 的流速将2倍连续稀释的Fab (0.78nM至500nM)注入含0.05%吐温20的PBS(PBST)中。用简单一对一朗缪尔(Langmuir)结合模型 (BIAcore 评估程序3.2版)，通过同时设置结合和解离感应值 (sensorgram) 来计算结

合率(k_{on})和解离率(k_{off})。平衡解离常数(K_d) 算作 k_{off}/k_{on} 比率。如参见, Chen, Y., 等, (1999) *J. Mol Biol* 293: 865-881。如果用以上表面等离子共振测试得到的结合速率超过 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$, 则可用荧光淬灭技术测定结合速率, 所述技术在分光计所测的浓度逐渐增加的抗原存在的情况下, 可于 25°C 测量到PBS (pH 7.2) 中含20nM抗-抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度的增加或降低(激发= 295 nm; 发射= 340 nm, 16 nm 带通(band-pass), 所述分光计如装断流装置的光谱测定仪(Aviv Instruments)或带有搅拌管的8000系列SLM-Aminco分光光度计(ThermoSpectronic)。

根据本发明的“结合速率(on-rate)”或“结合速率(rate of association)”或“结合作用速率(association rate)”或“ k_{on} ”也可用同样的上述表面等离子共振技术来确定, 其使用了BIAcoreTM-2000或BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 与固定抗原CM5芯片于 25°C 以~10响应单位(RU)来进行。简而言之, 根据供应商的说明书, 用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐((N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride, EDC)和N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)来活化羧甲基化葡聚糖生物感应芯片(CM5, BIAcore Inc.)。用10mM乙酸钠(pH4.8)将抗原稀释成5ug/ml (~0.2uM), 然后以5ul/分钟的流速注入以获得约10响应单位(RU)的偶联蛋白质。然后, 注入1M乙醇胺以封闭未反应的基团。对于动力学测量, 于 25°C 以约25ul/min的流速将2倍连续稀释的Fab(0.78 nM至500nM)注入含0.05%吐温20的PBS(PBST)中。用简单一对一朗缪尔结合模型(BIAcore评估程序3.2版), 通过同时设置结合和解离感应值(sensorgram)来计算结合率(k_{on})和解离率(k_{off})。平衡解离常数(K_d) 算作 k_{off}/k_{on} 比率。如参见, Chen, Y., 等, (1999) *J. Mol Biol* 293: 865-881。而如果用以上表面等离子共振测试得到的结合速率超过 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$, 则优选用荧光淬灭技术测定结合速率, 所述技术在分光计所测的浓度逐渐增加的抗原存在的情况下, 可于 25°C 测量到PBS(pH 7.2) 中含20nM抗-抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度的增加或降低(激发=295 nm; 发射= 340nm, 16nm带通), 所述分光计如装断流装置的光谱测定仪(Aviv Instruments)或带有搅拌管的8000系列SLM-Aminco分光光度计(ThermoSpectronic)。在一个具体实施方式中, 根据本发明的“ K_d ”或“ K_d 值”, 通过放射性标记的抗原结合测试(RIA)来测定, 所述测试用感兴趣的抗体的Fab形式和抗原分子来进行, 如以下测试所述, 在存在未标记抗原连续滴定

的情况下, 通过用最低浓度的(^{125}I)-标记的抗原平衡Fab, 然后用抗-Fab 抗体包被的平板捕获结合的抗原, 由此测定了Fab针对抗原的溶液结合亲和力 (Chen, 等, (1999) *J. Mol Biol* 293: 865-881)。为了确定测试条件, 微滴定板(Dynex) 用溶于50 mM 碳酸钠 (pH 9.6)的5 ug/ml抗-Fab捕获抗体(Cappel Labs)包被过夜, 然后于室温 (约 23°C)用溶于PBS的2% (w/v) 牛血清白蛋白封闭2至5小时。在未吸附的平板 (Nunc #269620)中, 100 pM或26 pM [^{125}I]-抗原与连续稀释的感兴趣的Fab相混合(如, 等同于Presta等的 (1997) *Cancer Res.* 57: 4593-4599所述的抗-VEGF 抗体、Fab-12评估)。然后孵育感兴趣的Fab 过夜; 而孵育可持续较长时间 (如, 65 小时)以保证达到平衡。然后, 将混合物转移到捕获平板上, 于室温孵育一个小时。然后去除溶液, 并用溶于PBS 的0.1%吐温-20洗板8次。平板干后, 以150 ul/孔加入闪烁剂 (MicroScint-20; Packard) , 并在Topcount γ 计数器(Packard)上对平板计数10分钟。选择能带来小于或等于 20% 最大结合度的每种Fab的浓度, 用于竞争结合测试。选择能带来小于或等于 20% 最大结合度的每种Fab的浓度, 用于竞争结合测试。根据另一个具体实施方式, 通过用BIAcoreTM-2000或BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 与固定抗原 CM5 芯片于25°C, 以~10响应单位 (RU)用表面等离子共振测试来测定Kd或Kd值。简而言之, 根据供应商的说明书, 用N-乙基-N' -(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)来活化羧甲基化葡聚糖生物感应芯片 (CM5, BIAcore Inc.)。用10mM乙酸钠(pH4.8)将抗原稀释成5ug/ml (~0.2uM), 然后以 5ul/分钟的流速注入以获得约 10 响应单位 (RU) 的偶联蛋白质。注入抗原后, 注入1M 乙醇胺以封闭未反应的基团。对于动力学测量, 于25°C 以约 25ul/min 的流速将2倍连续稀释的Fab (0.78 nM 至500 nM) 注入含0.05%吐温20的PBS(PBST)中。用简单一对一朗缪尔结合模型 (BIAcore评估程序3.2版) , 通过同时设置结合和解离感应值 (sensorgram) 来计算结合率(k_{on})和解离率 (k_{off})。平衡解离常数(Kd) 算作 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 比率。如参见, Chen, Y., 等, (1999) *J. Mol Biol* 293: 865-881。如果用以上表面等离子共振测试得到的结合速率超过 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$, 则可用荧光淬灭技术测定结合速率, 所述技术在分光计所测的浓度逐渐增加的抗原存在的情况下, 可于25°C测量到PBS (pH 7.2) 中含20nM抗-抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度的增加或降低(激发 = 295 nm; 发射 = 340 nm, 16 nm 带通), 所述分

光计如装断流装置的光谱测定仪 (Aviv Instruments)或带有搅拌管的8000系列 SLM-Aminco分光光度计 (ThermoSpectronic)。

在一个具体实施方式中, 根据本发明的“结合速率”或“结合速率”或“结合作用速率”或“ k_{on} ”用同样的上述表面等离子共振技术来确定, 其使用了 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 与固定抗原 CM5 芯片于 25°C 以~10 响应单位 (RU) 来进行。简而言之, 根据供应商的说明书, 用 N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)来活化羧甲基化葡聚糖生物感应芯片 (CM5, BIAcore Inc.)。用 10mM 乙酸钠(pH4.8)将抗原稀释成 5ug/ml (~0.2uM), 然后以 5ul/分钟的流速注入以获得约 10 响应单位 (RU) 的偶联蛋白质。然后, 注入 1M 乙醇胺以封闭未反应的基团。对于动力学测量, 于 25°C 以约 25ul/min 的流速将 2 倍连续稀释的 Fab (0.78 nM 至 500 nM)注入含 0.05% 吐温 20 的 PBS(PBST)中。用简单一对朗缪尔结合模型 (BIAcore 评估程序 3.2 版), 通过同时设置结合和解离感应值 (sensorgram) 来计算结合率 (k_{on})和解离率(k_{off})。平衡解离常数(Kd) 算作 k_{off}/k_{on} 比率。如参见, Chen, Y., 等, (1999) J. Mol Biol 293: 865-881。而如果用以上表面等离子共振测试得到的结合速率超过 $10^6 M^{-1} S^{-1}$, 则可用荧光淬灭技术测定结合速率, 所述技术在分光计所测的浓度逐渐增加的抗原存在的情况下, 可于 25°C 测量到 PBS(pH 7.2)中含 20nM 抗-抗原抗体(Fab 形式)的荧光发射强度的增加或降低(激发=295 nm; 发射= 340 nm, 16 nm 带通), 所述分光计如装断流装置的光谱测定仪(Aviv Instruments)或带有搅拌管的 8000 系列 SLM-Aminco 分光光度计(ThermoSpectronic)。

本文中所用的短语“基本减少的”、或“基本不同的”, 表示两个数值(一般是与本发明抗体相关的一个和与参照/比较抗体相关的另一个)间足够高的差异性程度, 由此所属领域技术人员根据上下文中所述值(如, Kd 值, HAMA 应答)确定的生物特性, 会将两个值之间的差异看作为有统计学意义的。作为参照/比较抗体的值的函数, 所述两个值之间的差异优选大于约 10%、优选大于约 20%、优选大于约 30%、优选大于约 40%、优选大于约 50%。

与肽或多肽序列相关的“氨基酸序列同一性百分比(%)”定义为候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基百分比, 其由如

下方式获得，即对序列进行序列对比并在需要时引入缺位(gap)，以此获得最大百分比的序列同一性，而且不将任何保守替换看作为序列同一性的部分。为确定氨基酸序列同一性百分比的排列方式可通过所属领域各种现有技术来获得，例如，利用可公开获得的计算机软件，如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR)。所属领域技术人员可确定进行序列对比的合适参数，包括任何算法，其需要对在比较的全长序列上获得最大程度的排列。而本文为此，可利用序列比较的计算机程序 ALIGN-2 来产生%氨基酸序列同一性值，其中 ALIGN-2 程序的完整源代码由以下的表 A 提供。ALIGN-2 序列比较的计算机程序由 Genentech, Inc 编写，表 A 所示的源代码已经在美国版权局（华盛顿特区，20559）中被归档为用户文档，其登记为美国版权注册第 TXU510087 号。ALIGN-2 程序可通过 Genentech, Inc., South San Francisco, California 而公开获取，或可由下图 8 中提供的源代码来编译。ALIGN-2 程序应在 UNIX 操作系统（优选数位 UNIX V4.0D）上编译使用。所有序列比较参数可由 ALIGN-2 程序设置而不必改变。

在用 ALIGN-2 进行氨基酸序列比较的情况下，特定氨基酸序列 A 与、同或相对于特定氨基酸序列 B (其可以可选地被表达为，与、同或相对于特定氨基酸序列 B 具有或含某%氨基酸序列同一性的特定氨基酸序列 A)的%氨基酸序列同一性如下进行计算：

100 乘以分数 X/Y

其中在该 A 和 B 的序列对比中，X 是通过序列对比程序 ALIGN-2 算得的完全匹配的氨基酸残基数，而其中 Y 是 B 中的氨基酸残基总数。将能看到，当氨基酸序列 A 的长度不等于氨基酸序列 B 的长度时，A 与 B 的%氨基酸序列同一性将不等于 B 与 A 的%氨基酸序列同一性。

除非另外特别说明，如前一段所述，本文中所用的所有%氨基酸序列同一性值用 ALIGN-2 计算机程序来得到。

表 A

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M -8 /* value of a match with a stop */

int _day[26][26] = {
/*      A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S
T U V W X Y Z */
/* A */   {2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1,
1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */   {0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0,
0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */   {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5,
-4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */   {0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0,
0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */   {0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0,
0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */   {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4,
-3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */   {1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3,
1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */   {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1,
-1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */   {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2,
-1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */   {0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, 0, 0},
/* K */   {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0,
0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */   {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3,
-3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */   {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0,
-2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},

```

```

    /* N */    {0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1,
0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
    /* O */    {_M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M,
_M, 0, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
    /* P */    {1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0,
1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
    /* Q */    {0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1,
-1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
    /* R */    {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0,
-1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
    /* S */    {1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2,
1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
    /* T */    {1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1,
3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
    /* U */    {0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, 0, 0},
    /* V */    {0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2,
-1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
    /* W */    {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2,
-2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
    /* X */    {0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, 0, 0},
    /* Y */    {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4,
-3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
    /* Z */    {0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0,
0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP 24 /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS 1024 /* max jmps in an path */
#define MX 4 /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT 3 /* value of matching bases */
#define DMIS 0 /* penalty for mismatched bases */

```

```

#define DINS0      8  /* penalty for a gap */
#define DINS1      1  /* penalty per base */
#define PINS0      8  /* penalty for a gap */
#define PINS1      4  /* penalty per residue */

struct jmp {
    short      n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int      score; /* score at last jmp */
    long     offset; /* offset of prev block */
    short    ijmp; /* current jmp index */
    struct jmp jp; /* list of jmps */
};

struct path {
    int      spc; /* number of leading spaces */
    short    n[JMPs]; /* size of jmp (gap) */
    int      x[JMPs]; /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char      *ofile; /* output file name */
char      *namecx[2]; /* seq names: getseqs() */
char      *prog; /* prog name for err msgs */
char      *seqx[2]; /* seqs: getseqs() */
int      dmax; /* best diag: nw() */
int      dmax0; /* final diag */
int      dna; /* set if dna: main() */
int      endgaps; /* set if penalizing end gaps */
int      gapx, gapy; /* total gaps in seqs */
int      len0, len1; /* seq lens */
int      ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int      smax; /* max score: nw() */
int      *xbm; /* bitmap for matching */
long     offset; /* current offset in jmp file */
struct    diag*dx; /* holds diagonals */
struct    pathpp[2]; /* holds path for seqs */

```

```

char      *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char      *getseq(), *g_calloc();

/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage:  progs file1 file2
 *   where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 *   The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
 *   Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
 *   Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 *   A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 *   Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

static  _dbval[26] = {
    1, 14, 2, 13, 0, 0, 4, 11, 0, 0, 12, 0, 3, 15, 0, 0, 0, 5, 6, 8, 8, 7,
9, 0, 10, 0
};

static  _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac
,
av)
main
    int ac;
    char *av[];
    {

```

```

prog = av[0];
if (ac != 3) {
    fprintf(stderr, "usage:  %s file1 file2\n", prog);
    fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
    fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
    fprintf(stderr, "Any lines beginning with '; ' or '<' are ignored\n");
    fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
    exit(1);
}
namex[0] = av[1];
namex[1] = av[2];
seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

endgaps = 0;          /* 1 to penalize endgaps */
ofile = "align.out"; /* output file */

nw();      /* fill in the matrix, get the possible jmps */
readjmps(); /* get the actual jmps */
print();   /* print stats, alignment */

cleanup(0); /* unlink any tmp files */
}

/* do the alignment, return best score:  main()
 * dna:  values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro:  PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()
nw
{
    char      *px, *py;      /* seqs and ptrs */
    int      *ndely, *dely; /* keep track of dely */
    int      ndelx, delx;   /* keep track of delx */

```

```

int    *tmp;      /* for swapping row0, row1 */
int    mis;      /* score for each type */
int    ins0, ins1; /* insertion penalties */
register id;     /* diagonal index */
register ij;     /* jmp index */
register *col0, *col1; /* score for curr, last row */
register xx, yy;  /* index into seqs */

dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

smax = -10000;
if (endgaps) {
    for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
        ndely[yy] = yy;
    }
    col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
}
else
    for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
        dely[yy] = -ins0;

/* fill in match matrix
*/
for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
    /* initialize first entry in col
    */
    if (endgaps) {
        if (xx == 1)
            col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
        else
            col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
        ndelx = xx;
    }
}

```

```

    }
    else {
        col1[0] = 0;
        delx = -ins0;
        ndelx = 0;
    }
}

...nw

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongong del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (cndgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }

    /* update penalty for del in y seq;
     * favor new del over ongong del
     */

```

```

if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (coll[yy-1] - ins0 >= delx) {
        delx = coll[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else {
        delx -= ins1;
        ndelx++;
    }
} else {
    if (coll[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
        delx = coll[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else
        ndelx++;
}

/* pick the maximum score; we're favoring
 * mis over any del and delx over dely
 */

...nw

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    coll[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    coll[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
}

```



```

        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
    }
    else {
        col1[yy] = dely[yy];
        ij = dx[id].ijmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
            && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
            dx[id].ijmp++;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejmps(id);
                ij = dx[id].ijmp = 0;
                dx[id].offset = offset;
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
            }
        }
        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = dely[yy];
    }
    if (xx == len0 && yy < len1) {
        /* last col
        */
        if (endgaps)
            col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
        if (col1[yy] > smax) {
            smax = col1[yy];
            dmax = id;
        }
    }
}
if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;

```

```

    }
    (void) free((char *)ndely);
    (void) free((char *)dely);
    (void) free((char *)col0);
    (void) free((char *)col1);          }

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches:  print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]:  print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars:  pr_align()
 * nums() -- put out a number line:  dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]):  dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars:  dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* maximum output line */
#define P_SPC 3 /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

print()
print
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence:  %s (length = %d)\n", namex[0], len0);

```

```

    fprintf(fx, "<second sequence:  %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

```
/*
```

```
* trace back the best path, count matches
```

```
*/
```

```
static
```

```
getmat(lx      ,      ly      ,      firstgap      ,      lastgap)
```

```
getmat
```

```
int lx, ly;          /* "core" (minus endgaps) */
```

```
int firstgap, lastgap; /* leading trailing overlap */
```

```
{
```

```
int nm, i0, i1, siz0, siz1;
```

```
char outx[32];
```

```
double pct;
```

```

register    n0, n1;
register char *p0, *p1;

/* get total matches, score
 */
i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
n0 = pp[1].spc + 1;
n1 = pp[0].spc + 1;

nm = 0;
while ( *p0 && *p1 ) {
    if (siz0) {
        p1++;
        n1++;
        siz0--;
    }
    else if (siz1) {
        p0++;
        n0++;
        siz1--;
    }
    else {
        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
            nm++;
        if (n0++ == pp[0].x[i0])
            siz0 = pp[0].n[i0++];
        if (n1++ == pp[1].x[i1])
            siz1 = pp[1].n[i1++];
        p0++;
        p1++;
    }
}

/* pct homology:
 * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
 * else, knock off overhangs and take shorter core
 */
if (endgaps)

```

```

    lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

    fprintf(fx, "<gaps in first sequence : %d", gapx),
    ...getmat
    if (gapx) {
        (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
            ngapx, (dna)? "base": "residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base": "residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per
base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per
residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
    if (endgaps)
        fprintf(fx,
            "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
            lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else

```

```

        fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
    }

    static nm; /* matches in core -- for checking */
    static lmax; /* lengths of stripped file names */
    static ij[2]; /* jmp index for a path */
    static nc[2]; /* number at start of current line */
    static ni[2]; /* current elem number -- for gapping */
    static siz[2];
    static char*ps[2]; /* ptr to current element */
    static char*po[2]; /* ptr to next output char slot */
    static char out[2][P_LINE]; /* output line */
    static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

    /*
     * print alignment of described in struct path pp[]
     */
    static
    pr_align()
pr_align
    {
        int nn; /* char count */
        int more;
        register i;

        for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
            nm = stripname(name[i]);
            if (nm > lmax)
                lmax = nm;

            nc[i] = 1;
            ni[i] = 1;
            siz[i] = ij[i] = 0;
            ps[i] = seqx[i];
            po[i] = out[i];
        }

        for (nn = nm = 0, more = 1; more; )
    {
        ...pr_align
        for (i = more = 0; i < 2; i++) {

```

```

    /*
     * do we have more of this sequence?
     */
    if (!*ps[i])
        continue;

    more++;

    if (pp[i].spc) { /* leading space */
        *po[i]++ = ' ';
        pp[i].spc--;
    }
    else if (siz[i]) { /* in a gap */
        *po[i]++ = '-';
        siz[i]--;
    }
    else { /* we're putting a seq element
           */
        *po[i] = *ps[i];
        if (islower(*ps[i]))
            *ps[i] = toupper(*ps[i]);
        po[i]++;
        ps[i]++;

        /*
         * are we at next gap for this seq?
         */
        if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
            /*
             * we need to merge all gaps
             * at this location
             */
            siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
            while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
        }
        ni[i]++;
    }
}
if (++nn == olen || !more && nn) {

```

```

        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
dumpblock
{
    register i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';

                                                    ...dumpblock

    (void) putc('\n', fx);
    for (i = 0; i < 2; i++) {
        if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
            if (i == 0)
                nums(i);
            if (i == 0 && *out[1])
                stars();
            putline(i);
            if (i == 0 && *out[1])
                fprintf(fx, star);
            if (i == 1)
                nums(i);
        }
    }
}

/*

```



```

    * put out a number line:  dumpblock()
    */

    static
    nums(ix)
nums
    int ix;      /* index in out[] holding seq line */
    {
        char      nline[P_LINE];
        register  i, j;
        register char *pn, *px, *py;

        for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
            *pn = ' ';
        for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
            if (*py == ' ' || *py == '-')
                *pn = ' ';
            else {
                if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                    j = (i < 0)? -i : i;
                    for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                        *px = j%10 + '0';
                    if (i < 0)
                        *px = '-';
                }
                else
                    *pn = ' ';
                i++;
            }
        }
        *pn = '\0';
        nc[ix] = i;
        for (pn = nline; *pn; pn++)
            (void) putc(*pn, fx);
        (void) putc('\n', fx);
    }

    /*
    * put out a line (name, [num], seq, [num]):  dumpblock()
    */
    static

```

```

    putline(ix)
putline
    int    ix;          {

                                                                    ...putline

    int    i;
    register char    *px;

    for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ': ' ; px++, i++)
        (void) putc(*px, fx);
    for (; i < lmax+P_SPC; i++)
        (void) putc(' ', fx);

    /* these count from 1:
     * ni[] is current element (from 1)
     * nc[] is number at start of current line
     */
    for (px = out[ix]; *px; px++)
        (void) putc(*px&0x7F, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]):  dumpblock()
 */
static
stars()
stars
{
    int    i;
    register char    *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)

```

```

    *px++ = '!';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '!';
            else
                cx = '!';
        }
        else
            cx = '!';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

```

/*
 * strip path or prefix from pn, return len:  pr_align()
 */
static
stripname(pn)
stripname
char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
    register char    *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')

```

```

        py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file:  nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";    /* tmp file for jumps */
FILE    *fj;

int cleanup();    /* cleanup tmp file */
long lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)
cleanup
    int i;
    {
        if (fj)
            (void) unlink(jname);
        exit(i);
    }

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with '; ', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case

```

```

    */
    char *
    getseq(file , len)
getseq
    char *file; /* file name */
    int *len; /* seq len */
{
    char line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int natgc, tlen;
    FILE *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6,
file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

    ...getseq

    py = pseq + 4;
    *len = tlen;
    rewind(fp);

    while (fgets(line, 1024, fp)) {

```

```

        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++) {
            if (isupper(*px))
                *py++ = *px;
            else if (islower(*px))
                *py++ = toupper(*px);
            if (index("ATGCU", *(py-1)))
                natgc++;
        }
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}

char *
g_alloc(msg, nx, sz)
char *msg; /* program, calling routine */
int nx, sz; /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg,
                nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()

```

readjumps

```

{
    int    fd = -1;
    int    siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s:  can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;

```

...readjumps

```

        if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
            (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
            dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
        }
        else
            break;
    }
    if (i >= JMPS) {
        fprintf(stderr, "%s:  too many gaps in alignment\n", prog);
        cleanup(1);
    }
    if (j >= 0) {
        siz = dx[dmax].jp.n[j];
        xx = dx[dmax].jp.x[j];
        dmax += siz;
        if (siz < 0) { /* gap in second seq */
            pp[1].n[i1] = -siz;
            xx += siz;

```

```

        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}

/* reverse the order of jmps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```



```
/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any):  nw()
 */
writejumps(ix)
writejumps
    int ix;
    {
        char *mktemp();

        if (!fj) {
            if (mktemp(jname) < 0) {
                fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
                cleanup(1);
            }
            if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
                fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
                exit(1);
            }
        }
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
    }
}
```

本文中所述的术语“载体”要指的是能够转运与其相连的另一个核酸的核酸分子。一类载体是“质粒”，其指环状双链 DNA 环，其中连结着额外的 DNA 片段。另一类载体是噬菌体载体。另一类载体是病毒载体，其中将额外的 DNA 片段连结到病毒基因组中。某些载体能够在宿主细胞(如，带有细菌复制起始点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)中自主复制，所述宿主细胞中导入所述载体。其它载体(如，非附加型哺乳动物载体)可通过导入宿主细胞而整合到宿主细胞的基因组中，由此可随宿主基因组复制。另外，某些载体能够指导与它们可操作相连的基因的表达。这些载体在本文中被称为“重组表达载体”(或简称“重组载体”)。一般而言，重组 DNA 技术中应用的表达载体通常是质粒形式的。在本说明书中，“质粒”和“载体”可替换使用，而质粒是最常使用的载体形式。

“多核苷酸”或“核酸”在本文中可互换使用，指任何长度的核苷酸聚合物，包括 DNA 和 RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经过修饰的核苷酸或碱基、和/或其类似物，或者是可通过 DNA 或 RNA 聚合酶或者通过合成反应掺入聚合物的任何底物。多核苷酸可包含经过修饰的核苷酸，诸如甲基化核苷酸及其类似物。如果有的话，对核苷酸结构的修饰可以在装配聚合物之前或之后进行。核苷酸序列可以由非核苷酸组分中断。多核苷酸还可以在合成后修饰，诸如通过与标记物偶联。其它类型的修饰包括例如“帽”，将一个或多个天然存在核苷酸用类似物替代，核苷酸间修饰诸如例如具有不带电荷连接(例如磷酸甲酯、磷酸三酯、磷酰胺酯(phosphoamidate)、氨基甲酸酯等)和具有带电荷连接(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的修饰，含有附加部分(pendant moiety)，诸如例如蛋白质(例如核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚 L-赖氨酸等)的修饰、具有嵌入剂(例如吡啶、补骨脂素等)的修饰、含有螯合剂(例如金属、放射性金属、硼、氧化性金属等)的修饰、含有烷化剂的修饰、具有经修饰连接(例如 α 端基异构核酸(anomeric nucleic acid)等)的修饰、以及未修饰形式的多核苷酸。另外，通常存在于糖类中的任何羟基可用例如磷酸(phosphonate)基团、磷酸(phosphate)基团替换，用标准保护基团保护，或活化以制备与另外核苷酸的另外连接，或者可偶联至固相或半固相支持物。5'和 3'末端 OH 可磷酸化或者用胺或 1-20 个碳原子的有机加帽基团模块取代。其它羟基也可衍生成标准保护基团。多核苷酸还可含有本领域普遍知道的核糖或脱氧

核糖糖类的类似物形式, 包括例如 2'-氧-甲基、2'-氧-烯丙基、2'-氟-或 2'-叠氮-核糖, 碳环糖类似物, α -端基异构糖, 差向异构糖诸如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖, 无环类似物(acyclic analog)、及脱碱基核苷类似物(abasic nucleoside)诸如甲基核糖核苷。可用备选连接基团替换一个或多个磷酸二酯连接。这些备选连接基团包括但不限于如下实施方案, 其中磷酸酯用 P(O)S (“硫代酸酯”(thioate))、P(S)S (“二硫代酸酯”(dithioate))、(O)NR₂ (“酰胺酯”(amidate))、P(O)R、P(O)OR'、CO 或 CH₂ (“甲缩醛”(formacetal)) 替代, 其中 R 或 R'各自独立为 H 或者取代或未取代的烷基 (1-20 个 C), 任选含有醚 (-O-)连接、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基(araldyl)。并非多核苷酸中的所有连接都必需是相同的。上述描述适用于本文中提及的所有多核苷酸, 包括 RNA 和 DNA。

“寡核苷酸”在用于本文时一般指短多核苷酸, 通常是单链的, 通常是合成的, 长度通常但不是必需小于约 200 个核苷酸。术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”并不互相排斥。上文关于多核苷酸的描述平等且完全适用于寡核苷酸。

术语“抗体”和“免疫球蛋白”可在最广意义上替换使用, 包括单克隆抗体(例如, 全长或完整的单克隆抗体)、多克隆抗体、多价抗体、多特异性抗体(如, 双特异性抗体, 只要它们显示出所需的生物活性), 也可以包括某些抗体片段(如本文中较详细描述)。抗体可以是人的、人源化的和/或亲和力成熟的。

“抗体片段”仅包含完整抗体的一部分, 其中所述部分优选保留至少一个、优选大多数或所有功能, 所述功能通常与完整抗体中存在的该部分相关。在一个具体实施方式中, 抗体片段含完整抗体的抗原结合位点, 因此保留了结合抗原的能力。在另一个具体实施方式中, 抗体片段, 例如含 Fc 区的抗体片段, 保留了至少一种生物功能, 所述功能通常与完整抗体中存在的 Fc 区相关, 如 FcRn 结合、抗体半衰期调节、ADCC 功能以及补体结合性。在一个具体实施方式中, 抗体片段是单价抗体, 其具有与完整抗体基本相似的体内半衰期。例如, 这种抗体片段可包含与能够为该片段带来体内稳定性的 Fc 序列相连的抗原结合臂。

本文中所用的术语“单克隆抗体”指得自基本均一的抗体群的抗体, 即, 除了可能少量存在的天然产生的突变, 所述群中所包含的各个抗体是完全

相同的。单克隆抗体是高度特异的，针对单一抗原。更进一步，与典型包含了针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制品相反，每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。

本文中的单克隆抗体特别包括了“嵌合”抗体及其片段，其中一部分重和/或轻链与源自特定物种的或属于特定抗体类型或亚型的抗体的相应序列相同或同源，而链的剩余部分与源自另一种物种的或属于另一种抗体类型或亚型的抗体的相应序列相同或同源，只要它们显示出所需的生物活性(美国专利第 4, 816, 567 号; 和 Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984))。

“人源化的”形式的非人(如, 鼠)抗体是嵌合抗体, 其含有衍生自非人免疫球蛋白的最少序列。人源化抗体的大部分是人免疫球蛋白(受体抗体), 其中受体高变区的残基替换为非人种(供体抗体)的高变区的残基, 如具有所需特异性、亲和力、和能力的小鼠、大鼠、兔或非人灵长动物的。在一些情况下, 人免疫球蛋白框架区(FR)的残基替换为相应的非人残基。更进一步, 人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中找不到的残基。制备这些修饰可以进一步改善抗体性能。一般而言, 人源化抗体将包含基本完整的至少一个、典型两个可变结构域, 其中完整或基本完整的高变环对应于非人免疫球蛋白的那些, 而且完整或基本完整的 FR 是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体任选也将包含至少一部分免疫球蛋白的恒定区(Fc), 典型地是人免疫球蛋白的。进一步的详情参见 Jones 等, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann 等, Nature 332: 323-329 (1988); 和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)。也可参见以下综述及其中引用的文献: Vaswani 和 Hamilton, Ann. Allergy, Asthuma & Immunol. 1: 105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1038 (1995); Hurle 和 Gross, Curr. Op. Biotech. 5: 428-433 (1994)。

“抗原”是预先确定的抗原, 抗体能选择性与其结合。靶抗原可以是多肽、碳水化合物、核酸、脂质、半抗原或其它天然产生的或合成的化合物。优选地, 靶抗原是多肽。用于本文中的“受体人框架”是这样的框架, 其含源自人免疫球蛋白框架的或来自人共有框架的 VL 或 VH 框架的氨基酸序列。“源自”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可包含与其相同的氨基酸序列, 或可包含预先存在的氨基酸序列改变。当存在预先存在的氨基

酸序列改变时, 优选存在不超过 5 个并优选 4 个或更少、或 3 或更少的预先存在的氨基酸改变。当预先存在的氨基酸改变存在于 VH 中时, 优选那些改变只在第 71H、73H 和 78H 位中的三个、两个或一个位置上; 例如, 在那些位置上的氨基酸残基可以是 71A、73T 和/或 78A。在一个具体实施方式中, VL 受体人框架与 VL 人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列在序列上完全相同。

“人共有框架”是这样的框架, 其代表在人免疫球蛋白 VL 或 VH 框架序列筛选中最常存在的氨基酸残基。一般地, 从可变结构域序列亚型中选择人免疫球蛋白 VL 或 VH 序列。一般地, 序列亚型是如 Kabat 等所述的亚型。在一个具体实施方式中, 对于 VL, 亚型是如 Kabat 等所述的亚型 κ I。在一个具体实施方式中, 对于 VH, 亚型是如 Kabat 等所述的亚型 III。

“VL 亚型 I 共有框架”含有得自 Kabat 等的可变轻链 κ 亚型 I 氨基酸序列中的共有序列。在一个具体实施方式中, VL 亚型 I 共有框架氨基酸序列含每个下列序列的至少一部分或全部:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC (SEQ ID NO:34)-L1-WYQQKPGKAPKLLI (SEQ ID NO:35)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:36)-L3-FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:37)。

“VH 亚型 III 共有框架”含有得自 Kabat 等的可变重链亚型 III 氨基酸序列中的共有序列。在一个具体实施方式中, VH 亚型 III 共有框架氨基酸序列含每个下列序列的至少一部分或全部:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:38)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:39)-H2-RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO:40)-H3-WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:41)。

“未修饰的人框架”是人框架, 其具有与受体人框架相同的氨基酸序列, 如在受体人框架中缺少人向非人氨基酸的替换。

本文中所用的“改变的高变区”是这样的高变区, 其中包含一个或多个(如一个至约 16 个) 氨基酸替换。

本文中所用的“未修饰的高变区”是这样的高变区，其具有与从其衍生来的非人抗体相同的氨基酸序列，即其中没有个或多个氨基酸替换的序列。

术语“高变区”、“HVR”、或“HV”，在本文中用时，是指抗体可变结构域区，其在序列中是高变的和/或形成结构限制性环。一般地，抗体包含六个高变区；三个在 VH (H1、H2、H3)中，三个在 VL (L1、L2、L3)中。有许多高变区的描述被使用，它们都纳入本文中。Kabat 互补决定区 (CDR) 是以序列可变性为基础的，而且是最常使用的(Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版. 公共卫生服务部, 国家健康研究员, Bethesda, MD. (1991)). Chothia 代之以指的是替换的结构环位置(Chothia 和 Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). AbM 高变区在 Kabat CDR 和 Chothia 结构环之间做出了折衷, 并由牛津分子 AbM 抗体建模软件所使用。“接触(contact)”高变区是以可用的复合晶体结构分析为基础。来自这些高变区中的每一个的残基如下所列:

表 1

环	Kabat	AbM	Chothia	接触
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1 Kabat 编号	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1 Chothia编号	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

高变区可包含如下“延伸的高变区”：在 VL 中的 24-36 或 24-34 (L1)、46-56 或 49-56 或 50-56 或 52-56 (L2) 和 89-97 (L3) 和在 VH 中的 26-35 (H1)、50-65 或 49-65 (H2) 和 93-102、94-102 或 95-102 (H3)。根据 Kabat 等 (同上),

对这些定义中的每一个可进行可变结构域残基编号。

“框架”或“FR”残基是除了如本文所定义的高变区残基之外的那些可变结构域残基。

“人抗体”是带有氨基酸序列的抗体，所述氨基酸序列对应于由人所产生抗体的序列，和/或制备它可利用用于生产如本文所述的人抗体的任何技术。该人抗体的定义明确排除了含非人抗原结合残基的人源化抗体。

“亲和力成熟的”抗体是在其一个或多个 CDR 中带有一个或多个改变的抗体，所述改变使得抗原的抗体相对于不带那些改变的亲本抗体，亲和力得以改进。优选的亲和力成熟的抗体将具有纳摩尔或皮摩尔级的靶抗原亲和力。亲和力成熟的抗体由现有已知的方法生产。Marks 等 *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992) 记载了通过 VH 和 VL 结构域改组而得的亲和力成熟。CDR 和/或框架残基的随机突变如下所述：Barbas 等 *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91: 3809-3813 (1994); Schier 等 *Gene* 169: 147-155 (1995); Yelton 等 *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson 等, *J. Immunol.* 154(7): 3310-9 (1995); 和 Hawkins 等, *J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992)。

“阻断”抗体或“拮抗剂”抗体是抑制或降低其结合的抗原的生物活性的抗体。优选的阻断抗体或拮抗剂抗体基本或完全抑制抗原的生物活性。

本文中所用的“激动剂抗体”是能模拟感兴趣多肽的至少一个功能活性的抗体。

“病症”是可得益于用本发明的物质/分子或方法治疗的任何状况。这包括了慢性和急性病症或疾病，其包括使哺乳动物易患病症的那些可疑病理状况。本文中治疗的病症的非限制性的实例包括恶性和良性肿瘤；非白血病和淋巴恶性肿瘤；神经元、神经胶质、星形胶质细胞、下丘脑和其它腺体、巨噬细胞、上皮、间质和囊胚腔的疾病；和炎性、免疫相关的病症和其它与血管发生相关的病症。

术语“免疫相关的疾病”指的是这样的疾病，其由哺乳动物免疫系统的成分造成、介导或以其它方式导致哺乳动物的病态。还包括了免疫应答的激发或干涉对疾病进程有缓和作用的疾病。该术语包括了免疫介导的炎症、非免疫介导的炎症、感染性疾病、免疫缺陷病、瘤形成等。

免疫相关的疾病和炎症的例子（其中一些是免疫或 T 细胞介导的）能根据本发明而治疗，其包括系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、青少年慢

性关节炎、脊椎关节病、系统性硬化病(硬皮病)、特发性炎性肌病(皮肌炎、多肌炎)、斯耶格伦氏(Sjogren)综合征、系统性血管炎、结节病、自身免疫性溶血性贫血(免疫性全血细胞减少症、阵发性夜间血红蛋白尿)、自身免疫性血小板减少症(特发性血小板减少性紫癜、免疫介导的血小板减少症)、甲状腺炎(格雷夫斯氏(Graves)病、桥本氏(Hashimoto)甲状腺炎、幼年型淋巴细胞性甲状腺炎、萎缩性甲状腺炎)、糖尿病、免疫介导的肾病(肾小球肾炎、肾小管间质性肾炎)、中枢和周围神经系统的脱髓鞘病诸如多发性硬化病、特发性脱髓鞘多神经病或格-巴二氏(Guillain-Barré)综合征、和慢性炎性脱髓鞘多神经病、肝胆病诸如传染性肝炎(甲型、乙型、丙型、丁型、戊型和其它非嗜肝病毒肝炎)、自身免疫性慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、肉芽肿性肝炎、和硬化性胆管炎、炎性和纤维化肺病诸如炎性肠病(溃疡性结肠炎:克罗恩氏(Crohn)病)、麸胶敏感性肠病、和惠普尔氏(Whipple)病、自身免疫性或免疫介导的皮肤病包括大疱性皮肤病、多形红斑和接触性皮炎、银屑病、变应性疾病诸如哮喘、变应性鼻炎、特应性皮炎、食物超敏反应和荨麻疹、肺的免疫学疾病诸如嗜曙红细胞性肺炎、特发性肺纤维化和超敏感性肺炎、移植相关疾病包括移植物排斥和移植物抗宿主疾病。传染病包括 AIDS (HIV 感染)、甲型、乙型、丙型、丁型和戊型肝炎、细菌感染、真菌感染、原生动物感染和寄生虫感染。

“自身免疫性病症”或“自身免疫性疾病”在本文中可替换使用,指源于个体自身组织且针对个体自身组织的非恶性疾病或紊乱。本文中所述自身免疫病明确排除恶性或癌性疾病或状况,特别排除 B 细胞淋巴瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞白血病和慢性成髓细胞白血病。自身免疫性疾病或紊乱的例子包括但不限于炎性应答,诸如炎性皮肤病,包括银屑病和皮炎(例如特应性皮炎);系统性硬皮病和硬化症;与炎性肠病有关的应答(诸如克罗恩氏(Crohn)病和溃疡性结肠炎);呼吸窘迫综合征(包括成人呼吸窘迫综合征; ARDS);皮炎;脑膜炎;脑炎;葡萄膜炎;结肠炎;肾小球肾炎;过敏状况,诸如湿疹和哮喘及涉及 T 细胞浸润和慢性炎性应答的其它状况;动脉粥样硬化;白细胞粘着缺陷;类风湿性关节炎;系统性红斑狼疮(SLE);糖尿病(例如 I 型糖尿病或胰岛素依赖性糖尿病);多发性硬化症;雷诺氏(Reynaud)综合征;自身免疫性甲状腺炎;变应性脑脊髓炎;斯耶格伦氏(Sjogren)综合征;幼发型糖尿病;

及通常在肺结核、结节病、多肌炎、肉芽肿病和脉管炎中发现的与细胞因子和 T-淋巴细胞介导的急性和迟发性超敏反应有关的免疫应答；恶性贫血（阿狄森氏(Addison)病）；涉及白细胞渗出的疾病；中枢神经系统(CNS)炎性紊乱；多器官损伤综合征；溶血性贫血（包括但不限于冷球蛋白血症或库姆斯氏(Coombs)阳性贫血）；重症肌无力；抗原-抗体复合物介导的疾病；抗肾小球基膜病；抗磷脂综合征；过敏性神经炎；格雷夫斯氏(Graves)病；朗-伊二氏(Lambert-Eaton)肌无力综合征；大疱性类天疱疮；天疱疮；自身免疫性多种内分泌腺病；莱特氏(Reiter)病；僵人(stiff-man)综合征；贝切特氏(Behcet)病；巨细胞动脉炎；免疫复合物肾炎；IgA 肾病；IgM 多神经病；免疫性血小板减少性紫癜(ITP)或自身免疫性血小板减少症等。

术语“胃肠炎症疾病”是一组慢性疾病，其造成粘膜中的炎症和/或溃疡。由此，术语包括炎症性肠病（如，克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、不明性结肠炎和感染性结肠炎）、粘膜炎（如，口腔粘膜炎、胃肠粘膜炎、鼻粘膜炎和直肠炎）、坏死性小肠结肠炎和食道炎。

术语“细胞增殖性疾病”和“增殖性疾病”指与某种程度的异常细胞增殖相关的疾病。在一个具体实施方式中，细胞增殖性疾病是癌。

本文中所用的“肿瘤”，指所有瘤细胞的生长和增殖（无论是否是恶性或良性的）和所有原癌和癌细胞和组织。术语“癌”、“癌的”、“细胞增殖性疾病”，“增殖性疾病”和“肿瘤”在本文中并不互相排斥。

术语“癌”和“癌的”是指或描述了哺乳动物的生理状况，其典型的特征是无节制的细胞生长/增殖。癌的实例包括但不限于，恶性瘤、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤、和白血病。这些癌更特定的实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺部腺癌、肺部鳞癌、腹膜癌、肝细胞癌(hepatocellular cancer)、胃肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、肝细胞瘤(hepatoma)、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫瘤、唾腺瘤、肾癌、肝癌(liver cancer)、前列腺癌、阴门癌、甲状腺癌、肝恶性瘤(hepatic carcinoma)和各类头和颈癌。

血管发生调节异常可导致可用本发明组合物和方法治疗的许多紊乱。这些紊乱包括非肿瘤性的和肿瘤性的两类状况。肿瘤性的包括但不限于上文所描述的。非肿瘤性紊乱包括但不限于不想要的或异常的肥大、关节炎、类风湿性关节炎(RA)、银屑病、银屑病斑块、结节病、动脉粥样硬化、动

脉粥样硬化斑块、糖尿病性和其它增殖性视网膜病包括早产儿视网膜病、晶状体后纤维组织增生、新生血管性青光眼、年龄相关黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿、角膜新血管形成、角膜移植片新血管形成、角膜移植片排斥、视网膜/脉络膜新血管形成、眼角的新血管形成(发红)、眼新血管疾病、血管再狭窄、动静脉畸形(AVM)、脑膜瘤、血管瘤、血管纤维瘤、甲状腺增生(包括格雷夫斯氏(Graves)病)、角膜和其它组织的移植、慢性炎症、急性肺损伤/ARDS、脓毒病、原发性肺动脉高压、恶性肺积液(malignant pulmonary effusion)、脑水肿(例如与急性中风/闭合性头部损伤/外伤有关的)、滑液炎症、RA中的血管翳形成、骨化性肌炎、肥大性骨形成、骨关节炎(OA)、顽固性腹水、多囊性卵巢病、子宫内膜异位、第三空间流体病(3rd spacing of fluid diseases)(胰腺炎、间隔综合征、烧伤、肠病)、子宫平滑肌瘤(uterine fibroids)、早产、慢性炎症诸如IBD(克罗恩氏(Crohn)病和溃疡性结肠炎)、肾同种异体移植排斥、炎性肠病、肾病综合征、不想要的或异常的组织块生长(非癌性的)、血友病性关节、肥厚性瘢痕、毛发生长的抑制、奥-韦二氏(Osler-Weber)综合征、脓性肉芽肿晶状体后纤维组织增生、硬皮病、沙眼、血管粘连、滑膜炎、皮炎、先兆子痫、腹水、心包积液(诸如与心包炎有关的)、以及胸腔积液。

在用于本文时,“治疗”指试图改变所治疗个体或细胞的自然进程的临床干预,可以是为了预防或在临床病理学的进程中进行。治疗的期望效果包括预防疾病的发生或复发、缓解症状、削弱疾病的任何直接或间接病理学后果、预防转移、减缓疾病进展的速率、改善或减轻疾病状态、及免除或改善预后。在有些实施方案中,本发明的抗体用于延迟疾病或紊乱的发展。

“有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的治疗或预防效果的量。

本发明物质/分子、激动剂或拮抗剂的“治疗有效量”可根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重及该物质/分子、激动剂或拮抗剂在个体中引发期望应答的能力等因素而变化。治疗有效量还指该物质/分子、激动剂或拮抗剂的治疗有益效果胜过任何有毒或有害后果的数量。“预防有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的预防效果的数量。通常而非必然,由于预防剂量是在疾病发作之前或在疾病的早期用于受试者的,因此预防有效量将低于治疗有效量。

术语“细胞毒剂”在用于本文时指抑制或防止细胞的功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语意图包括：放射性同位素，例如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³² 和 Lu 的放射性同位素；化疗剂，例如甲氨蝶呤(methotrexate)、阿霉素(adriamicin)、长春花生物碱(vinca alkaloids) (长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、依托泊苷(etoposide))、多柔比星(doxorubicin)、美法仑(melphalan)、丝裂霉素(mitomycin) C、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、柔红霉素(daunorubicin)或其它嵌入剂；酶及其片段，诸如溶核酶；抗生素；和毒素，诸如小分子毒素或者细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素，包括其片段和/或变体；及下文披露的各种抗肿瘤药或抗癌药。下文记载了其它细胞毒性剂。杀肿瘤药引起肿瘤细胞的破坏。

"化疗剂"是对癌症治疗有用的化合物。化疗剂的实例包括烷化剂，例如噻替派(thiotepa)和 CYTOXAN®环磷酰胺(cyclophosphamide)；磺酸烷基酯类(alkyl sulfonates)，例如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶类(aziridines)，例如苯佐替派(benzodepa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedopa)和乌瑞替派(uredepa)；乙撑亚胺类(ethylenimines)和甲基蜜胺类(methylamelamines)，包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙撑蜜胺(triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺(triethylene phosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine)；番荔枝内酯类(acetogenin) (特别是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone))； δ -9-四氢大麻酚(tetrahydrocannabinol) (屈大麻酚(dronabinol), MARINOL®)； β -拉帕醌(lapachone)；拉帕醇(lapachol)；秋水仙素类(colchicines)；白桦脂酸(betulinic acid)；喜树碱(camptothecin) (包括合成的类似物托泊替康(topotecan) (HYCAMTIN®)、CPT-11 (依立替康(irinotecan), CAMPTOSAR®)、乙酰喜树碱(acetylcamptothecin)、东莨菪亭(scopoletin)和 9-氨基喜树碱(aminocamptothecin))；苔藓抑素(bryostatin)；callystatin；CC-1065 (包括它的阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物)；鬼臼毒素(podophyllotoxin)；鬼臼酸(podophyllinic acid)；替尼泊苷(teniposide)；隐藻素类(cryptophycins) (特别是隐藻素 1 和隐藻素 8)；多拉司他汀(dolastatin)；duocarmycin (包括合成的类似物 KW-2189 和 CB1-TM1)；艾榴塞洛素(eleutherobin)；pancratistatin；sarcodictyin；海

绵抑素(spongistatin); 氮芥类(nitrogen mustards), 例如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、荼氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard); 亚硝脲类(nitrosoureas), 诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine); 抗生素, 例如烯二炔类(enediyne)抗生素(例如加利车霉素(calicheamicin), 特别是加利车霉素 γ II 和加利车霉素 ω II (例如, 参见 Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); 葱环类抗生素(dynemicin), 包括 dynemicin A; 埃斯波霉素(esperamicin); 以及新制癌素(neocarzinostatin)发色团(chromophore)和有关的色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素(actinomycin)、氨茴霉素(anthramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素 C (cactinomycin)、carabycin、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycin)、放线菌素 D (dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-二氮-5-氧-L 正亮氨酸、ADRIAMYCIN®多柔比星(doxorubicin) (包括吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素类(mitomycins)诸如丝裂霉素 C、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、potfiromycin、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链佐星(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin); 抗代谢物, 例如甲氨蝶呤和 5-氟尿嘧啶(5-FU); 叶酸类似物, 例如二甲叶酸(denopterin)、甲氨蝶呤、蝶酰三谷氨酸(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate); 嘌呤类似物, 例如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤(mercaptopurine)、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine); 嘧啶类似物, 例如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷

(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine); 雄激素, 例如卡鲁睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、表硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone); 抗肾上腺素, 例如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane); 叶酸补充剂, 例如甲酰四氢叶酸(folinic acid); 醋葡醛内酯(aceglatone); 醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid); 恩尿嘧啶(eniluracil); 安吡啶(amsacrine); bestrabucil; 比生群(bisantrene); 依达曲沙(edatraxate); 地磷酰胺(defosfamide); 地美可辛(demecolcine); 地吡醌(diaziquone); elfornithine; 依利醋铵(elliptinium acetate); epothilone; 依托格鲁(etoglucid); 硝酸镓; 羟脲(hydroxyurea); 香菇多糖(lentinan); 氯尼达明(lonidamine); 美登木素生物碱类(maytansinoids), 例如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocin); 米托胍脘(mitoguazone); 米托蒽醌(mitoxantrone); 莫哌达醇(mopidamol); 二胺硝吡啶(nitracrine); 喷司他丁(pentostatin); 蛋氨基芥(phenamet); 吡柔比星(pirarubicin); 洛索蒽醌(losoxantrone); 2-乙基酰肼(ethylhydrazide); 丙卡巴肼(procarbazine); PSK®多糖复合物(JHS Natural Products, Eugene, OR); 雷佐生(razoxane); 根霉素(rhizoxin); 西索菲兰(sizofiran); 螺旋锗(spirogermanium); 细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid); 三亚胺醌(triaziquone); 2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢菌素类(trichothecenes) (尤其是 T-2 毒素、疣孢菌素(verrucarin) A、杆孢菌素(roridin) A 和蛇行菌素(anguidin)); 乌拉坦(urethan); 长春地辛(vindesine) (ELDISINE®, FILDESIN®); 达卡巴嗪(dacarbazine); 甘露醇氮芥(mannomustine); 二溴甘露醇(mitobronitol); 二溴卫矛醇(mitolactol); 哌泊溴烷(pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷(arabinoside) (“Ara-C”); 塞替派(thiotepa); 类紫杉醇(taxoids), 例如, TAXOL®紫杉醇(paclitaxel) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ Cremophor-free、清蛋白改造的纳米颗粒剂型紫杉醇(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) 和 TAXOTERE®多西他塞(doxetaxel) (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); 苯丁酸氮芥(chlorambucil); 吉西他滨(gemcitabine) (GEMZAR®); 6-硫鸟嘌呤(thioguanine); 巯基嘌呤(mercaptopurine); 甲氨蝶呤; 铂类似物, 例如顺铂(cisplatin)和卡铂(carboplatin); 长春碱(vinblastine) (VELBAN®); 铂; 依

托泊苷(etoposide) (VP-16); 异环磷酰胺(ifosfamide); 米托蒽醌(mitoxantrone); 长春新碱(vincristine) (ONCOVIN®); 奥沙利铂(oxaliplatin); 甲酰四氢叶酸(leucovorin); 长春瑞滨(vinorelbine) (NAVELBINE®); 能灭瘤(novantrone); 依达曲沙(edatrexate); 道诺霉素(daunomycin); 氨基蝶呤(aminopterin); 伊本膦酸盐(ibandronate); 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸(DMFO); 类维 A 酸(retinoids), 诸如维 A 酸(retinoic acid); 卡培他滨(capecitabine) (XELODA®); 上述所有物质的药学可接受盐、酸或衍生物; 以及上述的两个或更多个组合, 例如 CHOP 和 FOLFOX, CHOP 是环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙(prednisolone)的联合治疗的缩写, FOLFOX 是奥沙利铂(oxaliplatin) (ELOXATIN™) 联合 5-FU 和甲酰四氢叶酸进行治疗的缩写。

调节、降低、阻断或抑制激素作用的抗激素制剂也包括在该定义内, 其中所述的激素可以促进癌症生长, 所述的抗激素制剂经常以系统或整体治疗形式存在。所述抗激素制剂可以是激素本身。实例包括抗雌激素剂和选择性的雌激素受体调节剂 (SERMs), 包括, 例如: 他莫昔芬(tamoxifen) (包括 NOLVADEX®他莫昔芬)、EVISTA®雷洛昔芬 (raloxifene)、屈洛昔芬 (droloxifene)、4-羟泰米芬 (4-hydroxytamoxifen)、曲沃昔芬 (trioxifene)、那洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮 (onapristone) 和 FARESTON®托瑞米芬 (toremifene); 抗孕酮类; 雌激素受体下调剂 (ERDs); 那些起抑制或阻断卵巢功能的制剂, 例如: 促黄体素释放激素 (LHRH) 激动剂, 例如 LUPRON®和 ELIGARD®醋酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)、醋酸戈舍瑞林(goserelin acetate)、醋酸布舍瑞林 (buserelin acetate) 和曲普瑞林(triptorelin); 其它抗雄激素剂, 例如氟他米特 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide) 和比卡米特(bicalutamide); 和抑制肾上腺中调节雌激素产生的芳香酶的芳香酶抑制剂, 例如, 4(5)-咪唑、氨鲁米特(aminoglutethimide)、MEGASE®醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)、AROMASIN®依西美坦 (exemestane)、formestanie、法偭唑 (fadrozole)、RIVISOR®伏罗唑 (vorozole)、FEMARA®来曲唑 (letrozole) 和 ARIMIDEX®阿那曲唑 (anastrozole)。另外, 化疗剂的这种定义包括二膦酸盐类(bisphosphonates), 例如氯膦酸盐 (clodronate) (例如: BONEFOS®或 OSTAC®)、DIDROCAL®依替膦酸钠 (etidronate)、NE-58095、ZOMETA®唑来膦酸/唑来膦酸盐

(zoledronic acid/zoledronate)、FOSAMAX®阿伦膦酸盐(alendronate)、AREDIA®帕米膦酸盐(pamidronate)、SKELID®替鲁膦酸盐(tiludronate)或ACTONEL®利塞膦酸盐(risedronate); 以及曲沙他滨(troxacitabine)(1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 特别是那些抑制信号路径中和异常细胞增殖有关联的基因的表达的寡核苷酸, 例如: PKC- α 、Raf、H-Ras和表皮生长因子受体(EGF-R); 疫苗, 例如 THERATOPE®疫苗和基因治疗疫苗, 例如: ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗和 VAXID®疫苗; LURTOTECAN®拓扑异构酶抑制剂; ABARELIX® rmRH; lapatinib ditosylate (ErbB-2 和 EGFR 双酪氨酸激酶小分子抑制剂, 又名 GW572016); 和上述所有物质的药学可接受盐、酸或衍生物。

这里使用的"生长抑制剂"指抑制细胞生长的化合物或组合物, 其中细胞的生长在依赖于体外或体内的 $\beta 7$ 活化。因此, 生长抑制剂可以是能显著降低 S 期 $\beta 7$ -依赖细胞百分比的制剂。生长抑制剂的实例包括阻断细胞周期进展(在除 S 期以外的其它时间点)的制剂, 例如诱导 G1 期和 M 期停止的制剂。典型的 M 期阻断剂包括长春药属(vinca)(长春新碱(vincristine)和长春碱(vinblastine)、紫杉烷类(taxane)和拓扑异构酶 II 抑制剂, 例如, 多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、依托泊苷(etoposide)和博来霉素(bleomycin)。那些阻断 G1 的制剂也可以延伸到 S 期阻断, 例如 DNA 烷化剂, 如他莫昔芬(tamoxifen)、泼尼松(prednisone)、达卡巴嗪(dacarbazine)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、顺铂(cisplatin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、5-氟尿嘧啶(flourouracil)和 ara-C。在 *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995)中, 特别是 13 页可以发现更多信息。紫杉烷类(紫杉醇(paclitaxel)和多西他赛(docetaxel))都是由紫杉树获得的抗癌药。由欧洲紫杉获得的多西他赛(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer)是紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb)的半合成类似物。紫杉醇和多西他赛促进微管蛋白二聚体组装成微管, 并通过防止解聚作用稳定微管, 这会导致细胞有丝分裂受到抑制。

“多柔比星(Doxorubicin)”是蒽环类抗生素。多柔比星的完整化学名是(8S-顺式)-10-[(3-氨基-2,3,6-三脱氧- α -L-来苏-吡喃己糖基)氧基]-7,8,9,10-四

氢 -6,8,11- 三羟基 -8-(羟基乙酰基)-1-甲氧基 -5,12-并四苯二酮 ((8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxo-hexapyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8-(hydroxyacetyl)-1-methoxy-5,12-naphthacenedione)。

用于与本发明的拮抗剂抗- β 7 抗体联合治疗的化合物包括抗体 (包括而不仅限于其它抗 β 7 拮抗剂抗体 (Fib 21、22、27、30 (Tidswell, M. (1997) 同上)或其人源化衍生物)、抗- α 4 抗体 (如 ANTEGEN®)、抗-TNF (REMICADE®))或非蛋白化合物(包括而不仅限于 5-ASA 化合物 ASACOL®、PENTASA™、ROWASA™、COLAZAL™) 和其它化合物(如巯基嘌呤和类固醇, 如强的松(prednisone))。在具体实施方式中, 本发明包括用本发明的拮抗剂抗- β 7 抗体单独治疗或与也可用于治疗炎症的第二化合物联合治疗患者 (如人患者) 的方法。在一个具体实施方式中, 第二化合物选自由 Fib 21、22、27、30、或其人源化衍生物、抗- α 4 抗体、ANTEGEN®、抗-TNF、REMICADE®、5-ASA 化合物、ASACOL®、PENTASA™、ROWASA™、COLAZAL™、巯基嘌呤(Purinethol)、类固醇、和强的松组成的组。在本发明的一个具体实施方式中, 给药本发明的拮抗剂抗- β 7 抗体能显著减少第二化合物的用量。在一个具体实施方式中, 所述第二化合物用量的减少为减少至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%。在本发明的一个具体实施方式中, 本发明的抗体和减少用量的第二化合物的联用将患者症状减轻到基本等于或好于单独给药第二化合物的程度。

产生能表现出 HAMA 应答减少或缺失的变体抗体

HAMA (人抗-小鼠 (也可用于人抗-大鼠或人抗-人))应答的减少或消除是临床开发合适治疗剂的重要方面。如参见: Khaxzaeli 等, J. Natl. Cancer Inst. (1988), 80: 937; Jaffers 等, Transplantation (1986), 41: 572; Shawler 等, J. Immunol. (1985), 135: 1530; Sears 等, J. Biol. Response Mod. (1984), 3: 138; Miller 等, Blood (1983), 62: 988; Hakimi 等, J. Immunol. (1991), 147: 1352; Reichmann 等, Nature (1988), 332: 323; Junghans 等, Cancer Res. (1990), 50: 1495。如本文所述, 本发明提供了人源化的抗体, 由此减少或消除 HAMA 应答。这些抗体的变体可进一步利用现有已知的常规方法来获得, 其中一些方法在下文会进一步描述。

例如，如本文所述的抗体的氨基酸序列可用作初始（亲本）序列，用以使框架和/或高变序列多样化。选出的与初始超变序列相连接的框架序列在本文中被称为受体人框架。受体人框架可来自或源自人免疫球蛋白（其 VL 和/或 VH 区），优选地，受体人框架来自或源自人共有框架序列，目前已经证实了该框架在人患者中具有最小的或没有免疫原性。

当受体源自人免疫球蛋白时，可任选根据其于供体框架序列的同源性来选出人框架序列，其中，将供体框架序列同人框架序列库中的各种人框架序列进行序列对比，选出与受体最同源的框架序列，由此得到所述同源性。

在一个具体实施方式中，本文中的人共有框架来自或源自 VH 亚型 III 和/或 VL_κ 亚型 I 共有框架序列。

因此，VH 受体人框架可包含一、二、三个或所有下列框架序列：

FR1 含 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 38)，

FR2 含 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 39)，

FR3 含 FR3 含 RFTISX1DX2SKNTX3YLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 42)，其中 X1 为 A 或 R，X2 为 T 或 N，和 X3 为 A、L、或 F，

FR4 含 WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41)。

VH 共有框架的实例包括：

人 VH 亚型 I 共有框架扣除 Kabat CDR (SEQ ID NO: 19)；

人 VH 亚型 I 共有框架扣除延伸的高变区 (SEQ ID NO: 20-22)；

人 VH 亚型 II 共有框架扣除 Kabat CDR (SEQ ID NO: 48)；

人 VH 亚型 II 共有框架扣除延伸的高变区 (SEQ ID NO: 49-51)；

人 VH 亚型 III 共有框架扣除 Kabat CDR (SEQ ID NO: 52)；

人 VH 亚型 III 共有框架扣除延伸的高变区 (SEQ ID NO: 53-55)；

人 VH 受体框架扣除 Kabat CDR (SEQ ID NO: 56)；

人 VH 受体框架扣除延伸的高变区 (SEQ ID NO: 57-58)；

人 VH 受体 2 框架扣除 Kabat CDR (SEQ ID NO: 59)；或

人 VH 受体 2 框架扣除延伸的高变区 (SEQ ID NO: 60-62)。

在一个具体实施方式中，VH 受体人框架包含一、二、三个或所有下列框架序列：

FR1 含 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 38),
FR2 含 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 39),
FR3 含 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO:
43)、RFTISRDTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 44)、
RFTISRDTSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO : 45) 、
RFTISADTSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 46),
FR4 含 WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41)。

VL 受体人框架可包含一、二、三个或所有下列框架序列:

FR1 含 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 34),
FR2 含 WYQQKPGKAPKLLI (SEQ ID NO: 35),
FR3 含 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:
36),
FR4 含 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 37).

VL 共有框架的实例包括:

人 VL κ 亚型 I 共有框架 (SEQ ID NO: 14);
人 VL κ 亚型 I 共有框架 (延伸的 HVR-L2) (SEQ ID NO: 15);
人 VL κ 亚型 II 共有框架 (SEQ ID NO: 16);
人 VL κ 亚型 III 共有框架 (SEQ ID NO: 17); 或
人 VL κ 亚型 IV 共有框架 (SEQ ID NO: 18)

当受体序列与所选的人框架序列完全相同时, 无论是否是来自人免疫球蛋白或人共有框架的, 本发明可预期, 相对于人免疫球蛋白序列或人共有框架序列, 受体序列可包含预先存在的氨基酸替换。这些预先存在的替换优选是最小化的; 通常相对于人免疫球蛋白序列或共有框架序列仅有四、三、二或一个氨基酸差别。

非人抗体的高变区残基被整合入 VL 和/或 VH 受体人框架中。例如, 可整合的残基是对应于 Kabat CDR 残基、Chothia 高变环残基、Abm 残基、和/或接触残基的残基。任选可整合如下延伸的高变区残基: 24-34 (L1)、49-56 (L2)和 89-97 (L3)、26-35 (H1)、50-65 或 49-65 (H2)和 93-102、94-102、或 95-102 (H3)。

高变区残基的“整合”如本文所述,因而将能理解该整合可通过各种方式来实现,例如,编码所需氨基酸序列的核酸可通过突变编码小鼠可变结构域序列的核酸来产生,由此其框架残基会变成受体人框架残基,或通过突变编码人可变结构域序列的核酸来产生,由此高变结构域残基会变成非人残基,或通过合成编码所需序列的核酸等来进行等等。

在本文的实例中,利用每个高变区的各寡聚核苷酸,通过 Kunkel 突变编码人受体序列的核酸来产生高变区移植变体。Kunkel 等, *Methods Enzymol.* 154: 367-382 (1987)。利用常规技术,可将适当的变化导入框架和/或高变区中,由此校正并重建适当的高变区-抗原相互作用。

噬菌体展示 (在上下文某些部分中,本文中也称为噬菌体展现) 可用作从随机产生的序列文库中产生并筛选出大量不同的潜在变体抗体的方便快捷方法。可是,其它制备和筛选变化的抗体的方法对普通技术人员来说也是可用的。

噬菌体展示技术提供了产生并筛选出结合配体的新蛋白质(如抗原)的有力工具。利用噬菌体展示技术能产生蛋白质变体的大文库,其可迅速筛选那些以高亲和力结合靶分子的序列。编码变体多肽的核酸一般与编码病毒衣壳蛋白的核酸序列融合,如与基因 III 蛋白质或基因 VIII 蛋白质融合。已经开发出了单价噬菌体展示系统,其中编码蛋白质或多肽的核酸序列与编码一部分基因 III 蛋白质的核酸序列融合。(Bass, S., *Proteins*, 8: 309 (1990); Lowman 和 Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3: 205 (1991))。在单价噬菌体展示系统中,能低水平表达融合基因,而且也表达野生型基因 III 蛋白质,由此可保持颗粒的感染性。许多专利披露了产生肽库并筛选那些文库的方法(如美国专利 5,23,86、美国专利 5,32,18、美国专利 5,80,17、美国专利 5,27,08 和美国专利 5,98,30)。

有许多方法可制备抗体或抗原结合多肽库,包括通过插入随机 DNA 序列来改变单个基因或通过克隆相关基因家族来制备。利用噬菌体展示来展示抗体或抗原结合片段的方法在美国专利 5,750,373、5,733,743、5,837,242、5,969,108、6,172,197、5,580,717 和 5,658,727 中有记载。然后筛选出文库中表达的具有所需特性的抗体或抗原结合蛋白质。

在模板核酸中替换所选的氨基酸的方法是已成熟的现有技术,其中的一些技术在本文中有记载。例如,可用 Kunkel 方法替换高变区残基。如

参见, Kunkel 等, *Methods Enzymol.* 154: 367-382 (1987)。

寡聚核苷酸序列包括一个或多个针对要改变的高变区残基而设计的密码子集合(codon set), 密码子集合是一组不同的核苷酸三联序列, 其用于编码所需变体氨基酸。根据 IUB 编码法, 密码子集合可用如下所示的命名特定核苷酸或核苷酸等摩尔混合物的符号来表示。

IUB 码

G 鸟嘌呤

A 腺嘌呤

T 胸腺嘧啶

C 胞嘧啶

R (A 或 G)

Y (C 或 T)

M (A 或 C)

K (G 或 T)

S (C 或 G)

W (A 或 T)

H (A 或 C 或 T)

B (C 或 G 或 T)

V (A 或 C 或 G)

D (A 或 G 或 T)H

N (A 或 C 或 G 或 T)

例如, 在密码子集合 DVK 中, D 可以是核苷酸 A 或 G 或 T; V 可以是 A 或 G 或 C; 和 K 可以是 G 或 T。该密码子集合可表示 18 种不同的密码子并可编码氨基酸 Ala、Trp、Tyr、Lys、Thr、Asn、Lys、Ser、Arg、Asp、Glu、Gly、和 Cys。

可用标准方法合成寡聚核苷酸或引物集合。例如, 可通过固相合成来合成寡聚核苷酸集合, 所含序列表示为密码子集合提供的所有可能的核苷酸三联体的组合, 而且其将编码所需氨基酸组。在某些位置上利用选出的“简并”核苷酸来合成寡聚核苷酸, 这是现有公知的技术。这些具有某些密码子

集合的核苷酸集合可利用商用核酸合成仪来合成(例如可得自 Applied Biosystems, Foster City, CA), 或可通过商业渠道获得(例如得自 Life Technologies, Rockville, MD)。所以典型地, 合成的具有特定密码子的寡聚核苷酸集合将包括序列有差异的多个寡聚核苷酸, 差异由整个序列内的密码子集合来产生。本发明所述的寡聚核苷酸具有能与可变结构域核酸模板杂交的序列, 而且也可为克隆目的而包括限制性内切酶位点。

在一个方法中, 编码变体氨基酸的核酸序列可通过寡聚核苷酸介导的突变来产生。该技术是现有公知的, 如 Zoller 等 *Nucleic Acids Res.* 10: 6487-6504(1987)所述。简而言之, 编码变体氨基酸的核酸序列通过将编码所需密码子集合的寡聚核苷酸集合与 DNA 模板杂交而产生, 其中模板是单链形式的质粒, 其包含了可变区的核酸模板序列。杂交后, 用 DNA 聚合酶合成出所述模板的完整的第二互补链, 由此所述模板将会纳入寡聚核苷酸引物, 而且将包含由寡聚核苷酸集合所提供的密码子集合。

一般使用长度为至少 25 个核苷酸的寡聚核苷酸。最优的寡聚核苷酸将具有 12 至 15 个核苷酸, 其在编码突变的核苷酸的每一端上完全与模板互补。这确保了寡聚核苷酸将适当地与单链 DNA 模板分子杂交。如 Crea 等的 *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 75: 5765 (1978)所述, 寡聚核苷酸可利用现有已知的技术方便地合成出来。

DNA 模板由源自噬菌体 M13 载体(合适的有可从商业渠道获得的 M13mp18 和 M13mp19 载体)的那些载体产生, 或如 Viera 等的 *Meth. Enzymol.*, 153: 3 (1987)所述, 由包含单链噬菌体复制起点的那些载体所产生。因而, 将被突变的 DNA 可插入这些载体之中的一个载体中, 从而产生单链模板。单链模板的制备在以上 Sambrook 等编的书的第 4.21-4.41 节中有叙述。

为了改变天然的 DNA 序列, 寡聚核苷酸在适当的杂交条件下与单链模板杂交。然后使用寡聚核苷酸作为合成引物, 加入 DNA 聚合酶(通常为 T7 DNA 聚合酶或 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段), 用以合成模板的互补链。由此生成异源双链核酸分子, 从而使 DNA 的一条链编码基因 1 的突变型, 而另一条链(初始模板)编码天然、未改变的基因 1 序列。然后将该异源双链核酸分子转化进合适的宿主细胞中, 通常转化进诸如大肠杆菌 JM101 的原核生物中。细胞增殖后, 将它们置于琼脂糖平板上, 并利用以

32-磷酸放射性标记了的寡聚核苷酸引物筛选，从而鉴定出含突变 DNA 的细菌克隆。

上面一段所述的方法可修正从而产生同质双链分子，其中质粒的两条链都包含突变。这些修正如下：单链寡聚核苷酸与如上所述的单链模板退火。三种脱氧核糖核苷酸（脱氧核糖腺苷 (dATP)、脱氧核糖鸟苷 (dGTP)、和脱氧核糖胸腺嘧啶核苷 (dTTP)）的混合物与被称为 dCTP-(aS) 的经修饰的脱氧核糖硫代胞嘧啶（其可得自 Amersham）混合。将该混合物加入到模板-寡聚核苷酸复合物中。向该混合物加入 DNA 聚合酶，由此产生了除了突变碱基之外其余都与模板完全相同的 DNA。另外，该新的 DNA 链将替换 dCTP 而含 dCTP-(aS)，其用于保护它防止限制性内切酶消化。双链异源双链核酸的模板链用合适的限制性内切酶进行酶切，然后可用 ExoIII 核酸酶或其它合适的核酸酶越过含突变位点的区域消化模板链。然后终止反应，保留仅剩部分单链的分子。然后利用 DNA 聚合酶在所有四种三磷酸脱氧核糖核苷、ATP、和 DNA 连接酶存在的情况下，形成完整的双链 DNA 同源双链(homoduplex)。然后可将该同质双链分子转化入合适的宿主细胞中。

如前所述，寡聚核苷酸集合中的序列有足够的长度能与模板核酸杂交，并且其也可以但不是必须包含限制性位点。DNA 模板可由源自噬菌体 M13 载体的那些载体产生，或如 Viera 等的 *Meth. Enzymol.*, 153: 3 (1987) 所述，由包含单链噬菌体复制起点的载体所产生。因而，将被突变的 DNA 可插入这些载体之中的一个载体中，从而产生单链模板。单链模板的制备在同上的 Sambrook 等编的书的第 4.21-4.41 节中有叙述。

根据另一种方法，通过提供上游和下游的寡聚核苷酸集合，每个集合有多个带有不同序列的寡聚核苷酸，不同序列由寡聚核苷酸序列中所提供的密码子集合来确定，由此生成文库。上游和下游的寡聚核苷酸集合，以及可变结构域的模板核酸序列，可用于聚合酶链式反应以产生 PCR 产物的“文库”。PCR 产物可被称为“核酸表达盒”，因为利用成熟的分子生物学技术，它们可与其它相关的或不相关的核酸序列（例如，病毒衣壳蛋白和二聚化结构域）融合。

PCR 引物序列包括一个或多个为高变区中溶剂可及的和高变的位点设计的密码子集合。如上所述，密码子集合是一组用于编码所需变体氨基酸的不同的核苷酸三联序列。

通过合适的筛选/选择步骤所选出的达到所需标准的抗体可利用标准重组技术分离并克隆。

载体、宿主细胞和重组方法

为了重组生产本发明的抗体，分离编码它的核酸并将其插入可复制的载体以进一步克隆(扩增 DNA)或表达。用常规方法(如，通过利用能够与编码抗体重和轻链的基因特异结合的寡聚核苷酸探针)能迅速分离编码抗体的 DNA 并测序。有许多载体可供利用。载体的选择部分可根据所用的宿主细胞来进行。一般地，优选的宿主细胞是原核或真核(一般为哺乳动物)来源的。

利用原核宿主细胞产生抗体：

载体构建

编码本发明抗体多肽成分的多聚核苷酸序列可以用标准重组技术获得。可从产生抗体的细胞(如杂交瘤细胞)中分离所需多聚核苷酸序列并测序。可选地，利用核苷酸合成仪或 PCR 技术可合成多聚核苷酸。一旦获得了，则将编码多肽的序列插入能够在原核宿主中复制并表达异源多聚核苷酸的重组载体。可利用的和现有已知的许多载体可用于本发明。合适载体的选择主要根据插入载体的核酸的大小和要用载体转化的特定宿主细胞来进行。根据其功能(异源多聚核苷酸的扩增或表达、或其组合)和与其所处的特定宿主细胞的相容性，每种载体可含不同成分。载体成分一般包括但不限于：复制起点、选择标记基因、启动子、核糖体结合位点(RBS)、信号序列、异源核酸插入和转录终止序列。

一般而言，包含复制子和调控序列的质粒载体，其源自与宿主细胞相容的物种，可被用于连接这些宿主。载体通常带有复制位点，以及在转化的细胞中产生能够带来表型选择的标记序列。例如，典型地可利用 pBR322(源自大肠杆菌菌种的质粒)来进行转化大肠杆菌。pBR322 包含编码氨苄青霉素(Amp)和四环素(Tet)抗性的基因，由此可提供鉴定转化的细胞的简单方法。pBR322、其衍生物或其它微生物质粒或噬菌体也可包含、或经修饰后可包含，可用于让微生物表达内源蛋白质的启动子。用于表达特定抗体的 pBR322 衍生物的实例在 Carter 等的美国专利 5,648,237 中有详细记载。

另外，包含复制子和调控序列的噬菌体载体，其与宿主微生物相容，可被用作转化载体来连接这些宿主。例如，可利用噬菌体(如 λGEM.TM.-11)

来制备可用于转化易感宿主细胞（如大肠杆菌 LE392）的重组载体。

本发明的表达载体可包含两种或更多的启动子-顺反子对，其能编码每一个多肽成分。启动子是非翻译的调节序列，其位于由其调节表达的顺反子的上游（5'）。原核启动子典型分成两类，诱导型和组成型。诱导型启动子是这样的启动子，在其控制下能启动水平增加了的顺反子的转录，其控制与培养条件的改变（如营养物的存在或缺失或温度变化）相关。

通过各种潜在宿主细胞识别大量启动子是公知的。通过限制性内切酶消化从源 DNA 中去除启动子并将分离的启动子序列插入本发明的载体中，所选的启动子就能够可操作地与编码轻或重链的顺反子 DNA 可操作地相连。天然启动子序列和许多异源启动子可用于指导靶基因的扩增和/或表达。在一些具体实施方式中，使用异源启动子，因为它们相对于天然靶多肽启动子，一般能带来所表达的靶基因的更多转录和更高产量。

适于在原核宿主中使用的启动子包括 PhoA 启动子、 β -半乳糖苷酶和乳糖启动子系统、色氨酸 (trp) 启动子系统和杂合启动子，如 tac 或 trc 启动子。可是，在细菌中起作用的其它启动子（如其它已知的细菌或噬菌体启动子）也是合适的。它们的核苷酸序列已经被公开，因此使普通技术人员能利用能带来任何所需限制性位点的接头或衔接头来可操作地将它们与编码靶轻和重链的顺反子相连(Siebenlist 等 (1980)细胞 20: 269)。

在本发明的一个方面，重组载体内的每个顺反子含分泌信号序列成分，其指导表达的多肽穿膜转移。一般而言，信号序列可以是载体的成分，或它可以是插入载体的靶多肽 DNA 的一部分。为本发明所选的信号序列应该是能被宿主细胞识别并加工（即由信号肽酶裂解）的序列。对于不能识别并加工异源多肽天然信号序列的原核宿主细胞，信号序列由所选原核信号序列替换，例如，替换为选自由碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp、或热稳定性肠毒素 II (STII) 前导序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA 和 MBP 组成的组的信号序列。在本发明的一个具体实施方式中，用在表达系统的顺反子中的信号序列是 STII 信号序列或其变体。

在另一方面，根据本发明产生的免疫球蛋白可在宿主细胞的细胞质中产生，因此不需要在每个顺反子中都出现信号序列。由此，表达、折叠并装配免疫球蛋白轻和重链，从而在细胞质中形成功能性免疫球蛋白。某些宿主株（如，大肠杆菌 trxB⁻株）提供了有利于二硫键形成的细胞质条件，由

此使得表达的蛋白质亚基能正确折叠和装配。Proba 和 Pluckthun Gene, 159: 203 (1995)。

本发明提供了表达系统，其中可以调节表达的多肽成分的数量比率，用以使本发明分泌和正确装配的抗体的产量最大化。这种调节至少部分可通过同时调节多肽成分的翻译强度来实现。

调节翻译强度的一种技术在 Simmons 等的美国专利 5,840,523 中有披露。它利用了顺反子内的翻译起始区(TIR)的变体。对于特定的 TIR，一系列氨基酸或核酸序列变体可在翻译强度范围内产生，由此提供了便利的方法，通过它可调节该因子以达到特定链所需表达的水平。TIR 变体可通过形成可改变氨基酸序列的密码子改变的常规突变技术来产生，然而优选核苷酸序列中的改变是沉默的。TIR 中的变化可包括如，Shine-Dalgarno 序列数量或间距的变化、以及信号序列的变化。产生突变的信号序列的一个方法是在编码序列起点产生“密码子库”，其不改变信号序列的氨基酸序列(即，改变是沉默的)。这可通过改变每个密码子的第三位核苷酸来实现；另外，一些氨基酸，如亮氨酸、丝氨酸、和精氨酸，具有多个可增加制备库复杂度的第一和第二位核苷酸。该突变方法在 Yansura 等 (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4: 151-158 中有详细描述。

优选地，为本文中的每个顺反子都构建在 TIR 强度范围内的载体集合。在各种 TIR 强度组合下，该有限的集合提供了每种链表达水平的对比以及所需抗体产物的产量。如 Simmons 等的美国专利 5,840,523 所述，TIR 强度可通过定量报告基因的表达水平而确定。根据翻译强度的比较，挑选所需的单个 TIR 以组合在本发明的表达载体构建体中。

适于表达本发明抗体的原核宿主细胞包括古细菌 (Archaeobacteria) 和真细菌 (Eubacteria)，诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体。有用细菌的实例包括埃希氏菌属 (Escherichia) (如大肠埃希氏菌(大肠杆菌))、芽孢杆菌属 (Bacillus) (如枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*)、肠杆菌属 (Enterobacteria)、假单胞菌属 (Pseudomonas) (如铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa*) 物种、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescans*)、克雷伯氏菌属 (Klebsiella)、变形菌属 (Proteus)、志贺氏菌属 (Shigella)、根瘤菌属 (Rhizobium)、透明颤菌属 (Vitreoscilla)、或副球菌属 (Paracoccus)。

在一个实施方案中，使用革兰氏阴性细胞。在一个实施方案中，使用大肠杆菌细胞作为本发明的宿主。大肠杆菌菌株的实例包括菌株 W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, 第2卷, Washington, D.C., 美国微生物学学会, 1987, 第1190-1219页; ATCC 保藏号 27,325) 及其衍生物, 包括具有基因型 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kan^R 的菌株 33D3 (美国专利号 5,639,635)。其它菌株及其衍生物, 诸如大肠杆菌 294 (ATCC 31,446)、大肠杆菌 B、大肠杆菌 λ 1776 (ATCC 31,537) 和大肠杆菌 RV308 (ATCC 31,608) 也是合适的。这些实例只是例示而非限制。本领域知道用于构建具有指定基因型的任何上述细菌衍生物的方法, 参见例如 Bass et al., Proteins 8: 309-314 (1990)。通常必需考虑复制子在细菌细胞中的可复制性来选择适宜的细菌。例如, 在使用众所周知的质粒诸如 pBR322、pBR325、pACYC177 或 pKN410 来提供复制子时, 大肠杆菌、沙雷氏菌属、或沙门氏菌属物种可能适于用作宿主。通常, 宿主细胞应当分泌最小量的蛋白水解酶, 而且可能希望在细胞培养中掺入额外的蛋白酶抑制剂。

抗体生成

用上述表达载体转化宿主细胞, 并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当改动的常规营养培养基中进行培养。

转化即将 DNA 导入原核宿主, 使得 DNA 能够进行复制, 或是作为染色体外元件或是通过染色体成分。根据所用宿主细胞, 使用适于这些细胞的标准技术进行转化。采用氯化钙的钙处理通常用于具有坚固细胞壁屏障的细菌细胞。另一种转化方法采用聚乙二醇/DMSO。使用的还有一种技术是电穿孔。

在本领域知道的且适于培养选定宿主细胞的培养基中培养用于生成本发明多肽的原核细胞。合适培养基的实例包括添加了必需营养补充物的 LB 培养基(Luria broth)。在有些实施方案中, 培养基还含有根据表达载体的构建而选择的选择剂, 以选择性容许包含表达载体的原核细胞生长。例如, 向用于培养表达氨苄青霉素抗性基因的细胞的培养基中添加氨苄青霉素。

除了碳、氮、和无机磷酸盐来源以外, 还可含有适当浓度的任何必需补充物, 或是单独加入或是作为与另一种补充物或培养基的混合物, 诸如复合氮源。任选的是, 培养基可含有一种或多种选自下组的还原剂: 谷胱

甘肽、半胱氨酸、胱胺、巯基乙酸盐/酯、二硫赤藓糖醇和二硫苏糖醇。

在合适的温度培养原核宿主细胞。例如，对于培养大肠杆菌，优选的温度范围是约 20°C 至约 39°C，更优选约 25°C 至约 37°C，甚至更优选约 30°C。主要取决于宿主生物体，培养基的 pH 可以是范围为约 5 至约 9 的任何 pH。对于大肠杆菌，pH 优选约 6.8 至约 7.4，更优选约 7.0。

如果本发明的表达载体中使用诱导型启动子，那么在适于激活启动子的条件下诱导蛋白质表达。在本发明的一个方面，使用 PhoA 启动子来控制多肽的转录。因此，为了诱导，在磷酸盐限制培养基中培养经过转化的宿主细胞。优选的是，磷酸盐限制培养基是 C.R.A.P 培养基（参见例如 Simmons et al., *J. Immunol. Methods* 263: 133-147 (2002)）。根据所采用的载体构建物，可采用多种其它诱导物，正如本领域所知道的。

在一个实施方案中，所表达的本发明多肽分泌到宿主细胞的周质中并从中回收。蛋白质回收通常牵涉破坏微生物，通常通过诸如渗透压震扰 (osmotic shock)、超声处理或裂解等手段。一旦细胞遭到破坏，可通过离心或过滤清除细胞碎片或整个细胞。可以通过例如亲和树脂层析进一步纯化蛋白质。或者，蛋白质可能转运到培养液中并从中分离。可从培养液清除细胞，并将培养物上清液过滤和浓缩，用于进一步纯化所生成蛋白质。可使用普遍知道的方法诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 和 Western 印迹分析进一步分离和鉴定所表达蛋白质。

在本发明的一个方面，通过发酵过程大量进行抗体生产。多种大规模补料-分批发酵流程可用于生产重组蛋白。大规模发酵具有至少 1000 升的容量，优选约 1,000 至 100,000 升的容量。这些发酵罐使用搅拌器叶轮来分配氧和养分，尤其是葡萄糖（优选的碳源/能源）。小规模发酵通常指在体积容量不超过约 100 升的发酵罐中进行的发酵，范围可以是约 1 升至约 100 升。

在发酵过程中，通常在将细胞在合适条件下培养至期望密度（如 OD₅₅₀ 约 180-220，在此阶段细胞处于早期稳定期）后启动蛋白质表达的诱导。根据所采用的载体构建物，可使用多种诱导物，正如本领域知道的和上文描述的。可在诱导前将细胞培养更短的时间。通常将细胞诱导约 12-50 小时，但是可使用更长或更短的诱导时间。

为了提高本发明多肽的产量和质量，可修改多项发酵条件。例如，为了改善所分泌抗体多肽的正确装配和折叠，可使用过度表达伴侣蛋白诸如

Dsb 蛋白 (DsbA、DsbB、DsbC、DsbD 和/或 DsbG) 或 FkpA (具有伴侣活性的一种肽基脯氨酰-顺式,反式-异构酶) 的额外载体来共转化宿主原核细胞。已经证明伴侣蛋白促进在细菌宿主细胞中生成的异源蛋白质的正确折叠和溶解度。Chen et al., *J. Biol. Chem.* 274: 19601-19605 (1999); Georgiou 等人, 美国专利 6,083,715; Georgiou 等人, 美国专利 6,027,888; Bothmann and Pluckthun, *J. Biol. Chem.* 275: 17100-17105 (2000); Ramm and Pluckthun, *J. Biol. Chem.* 275: 17106-17113 (2000); Arie et al., *Mol. Microbiol.* 39: 199-210 (2001)。

为了将所表达异源蛋白质 (尤其是对蛋白水解敏感的异源蛋白质) 的蛋白水解降至最低, 可将蛋白水解酶缺陷的某些宿主菌株用于本发明。例如, 可修饰宿主细胞菌株, 在编码已知细菌蛋白酶的基因中进行遗传突变, 诸如蛋白酶 III、OmpT、DegP、Tsp、蛋白酶 I、蛋白酶 Mi、蛋白酶 V、蛋白酶 VI 及其组合。可以获得有些大肠杆菌蛋白酶缺陷菌株, 参见例如 Joly et al., (1998) 见上文; Georgiou 等人, 美国专利 5,264,365; Georgiou 等人, 美国专利 5,508,192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance* 2: 63-72 (1996)。

在一个实施方案中, 在本发明的表达系统中使用蛋白水解酶缺陷且经过过度表达一种或多种伴侣蛋白的质粒转化的大肠杆菌菌株作为宿主细胞。

抗体纯化

在一个实施方案中, 进一步纯化本文中生成的抗体蛋白质以获得基本上同质的制品, 用于进一步的测定和使用。可采用本领域知道的标准蛋白质纯化方法。下面的流程是合适纯化流程的例示: 免疫亲和或离子交换柱上的分馏、乙醇沉淀、反相 HPLC、硅土或阳离子交换树脂诸如 DEAE 上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀、和使用例如 Sephadex G-75 的凝胶过滤。

在一个方面, 将固定在固相上的蛋白 A 用于本发明全长抗体产物的免疫亲和纯化。蛋白 A 是来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的 41kD 细胞壁蛋白质, 它以高亲和力结合抗体 Fc 区。Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)。蛋白 A 固定其上的固相优选具有玻璃或石英表面的柱子, 更优选可控孔径玻璃柱或硅胶柱。在有些应用中, 柱子以诸如甘油等试剂包被, 试图防止污染物的非特异粘附。

作为纯化的第一步，将衍生自如上所述细胞培养物的制备物施加到蛋白 A 固定化固相上，使得目的抗体特异结合蛋白 A。然后清洗固相以清除与固相非特异结合的污染物。最后通过洗脱从固相回收目的抗体。

使用真核宿主细胞生成抗体：

载体构件通常包括但不限于如下一种或多种：信号序列、复制起点、一种或多种标志基因、增强子元件、启动子、和转录终止序列。

(i) 信号序列构件

在真核宿主细胞中使用的载体还可在目的成熟蛋白质或多肽的 N 端包含信号序列或具有特异切割位点的其它多肽。优选受到宿主细胞识别并加工（即被信号肽酶切除）的异源信号序列。在哺乳动物细胞表达中，可利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导，例如单纯疱疹病毒 gD 信号。

将这些前体区的 DNA 连接到编码抗体的 DNA 的读码框中。

(ii) 复制起点

通常，哺乳动物表达载体不需要复制起点构件。例如，SV40 起点通常可能只因包含早期启动子才使用。

(iii) 选择基因构件

表达和克隆载体可包含选择基因，也称为选择标志。典型的选择基因编码如下蛋白质：(a) 赋予对抗生素或其它毒素的抗性，如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素；(b) 补足相应的营养缺陷；或(c) 提供不能从复合培养基获得的关键营养物。

选择方案的一个实例利用药物来阻滞宿主细胞的生长。经异源基因成功转化的那些细胞生成赋予药物抗性的蛋白质，因而幸免于选择方案。此类显性选择的实例使用药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

适于哺乳动物细胞的选择标志的另一个实例是能够鉴定有能力摄取抗体核酸的细胞的选择标志，诸如 DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白 I 和 II 优选灵长类金属硫蛋白基因、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

例如，首先通过将所有转化子在含有甲氨蝶呤（Mtx，DHFR 的一种竞争性拮抗剂）的培养基中进行培养来鉴定经 DHFR 选择基因转化的细胞。在采用野生型 DHFR 时，适宜的宿主细胞是 DHFR 活性缺陷的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系（如 ATCC CRL-9096）。

或者，可通过在含有针对选择标志的选择剂诸如氨基糖苷抗生素如卡那霉素、新霉素或 G418 的培养基中培养细胞来选择经编码抗体、野生型 DHFR 蛋白、和另一种选择标志诸如氨基糖苷 3'-磷酸转移酶(APH)的 DNA 序列转化或共转化的宿主细胞（特别是包含内源 DHFR 的野生型宿主）。参见美国专利 4,965,199。

(iv) 启动子构件

表达和克隆载体通常包含受到宿主生物体识别的启动子，且与抗体多肽核酸可操作连接。已知真核细胞的启动子序列。事实上，所有真核基因都具有富含 AT 区，它位于起始转录的位点上游约 25 至 30 个碱基处。在许多基因的转录起点上游 70 至 80 个碱基处发现的另一种序列是 CNCAAT 区，其中 N 可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的 3'端是 AATAAA 序列，它可能是向编码序列的 3'端添加聚腺苷酸(polyA)尾的信号。所有这些序列合适的插入真核表达载体中。

在哺乳动物宿主细胞中由载体转录抗体多肽受到例如从病毒（诸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒（诸如 2 型腺病毒）、牛乳头瘤病毒、禽类肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒、和猿猴病毒 40 (SV40)）基因组获得的、来自异源哺乳动物启动子（如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子）的、来自热休克启动子的启动子的控制，倘若这些启动子与宿主细胞系统相容的话。

方便的以 SV40 限制性片段的形式获得 SV40 病毒的早期和晚期启动子，该片段还包含 SV40 病毒复制起点。方便的以 HindIII E 限制性片段的形式获得人巨细胞病毒的立即早期启动子。美国专利 4,419,446 中公开了使用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达 DNA 的系统。美国专利 4,601,978 中记载了该系统的一种修改。关于在小鼠细胞中在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下表达人 β -干扰素 cDNA 还可参见 Reyes et al., Nature 297: 598-601 (1982)。或者，可使用劳氏肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

(v) 增强子元件构件

常常通过在载体中插入增强子序列来提高高等真核细胞对编码本发明抗体多肽的 DNA 的转录。现在知道来自哺乳动物基因（球蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、 α -胎蛋白和胰岛素）的许多增强子序列。然而，通常使用来

自真核细胞病毒的增强子。实例包括 SV40 复制起点晚期侧的增强子 (bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒复制起点晚期侧的增强子、和腺病毒增强子。关于激活真核启动子的增强元件还可参见 Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982)。增强子可剪接到载体中, 位于抗体多肽编码序列的 5'或 3'位置, 但是优选位于启动子的 5'位点。

(vi) 转录终止构件

在真核宿主细胞中使用的表达载体通常还包含终止转录和稳定 mRNA 所必需的序列。此类序列通常可从真核或病毒 DNA 或 cDNA 非翻译区的 5'端和偶尔的 3'端获得。这些区域包含在编码抗体的 mRNA 的非翻译区中转录成聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种有用的转录终止构件是牛生长激素聚腺苷酸化区。参见 WO94/11026 及其中公开的表达载体。

(vii) 宿主细胞的选择和转化

适于克隆或表达本文载体中的 DNA 的宿主细胞包括本文描述的高等真核细胞, 包括脊椎动物宿主细胞。脊椎动物细胞在培养(组织培养)中的繁殖已经成为常规流程。有用哺乳动物宿主细胞系的实例有经 SV40 转化的猴肾 CV1 系 (COS-7, ATCC CRL 1651)、人胚肾系 (293 细胞或为悬浮培养而亚克隆的 293 细胞, Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59 (1977))、幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL 10)、中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980))、小鼠塞托利(Sertoli)细胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980))、猴肾细胞 (CV1, ATCC CCL 70)、非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL 1587)、人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2)、犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34)、牛鼠(buffalo rat)肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442)、人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75)、人肝细胞 (Hep G2, HB 8065)、小鼠乳瘤 (MMT 060562, ATCC CCL 51)、TRI 细胞 (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982))、MRC 5 细胞、FS4 细胞和人肝细胞瘤(hepatoma)系 (Hep G2)。

为了生成抗体, 用上文所述表达或克隆载体转化宿主细胞, 并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当改动的常规营养培养基中进行培养。

(viii) 宿主细胞的培养

可在多种培养基中培养用于生成本发明抗体的宿主细胞。商品化培养

基诸如 Ham 氏 F10 (Sigma)、极限必需培养基 (MEM, Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、和 Dulbecco 氏修改 Eagle 氏培养基 (DMEM, Sigma) 适于培养宿主细胞。另外, 可使用下列文献中记载的任何培养基作为宿主细胞的培养基: Ham et al., Meth. Enz. 58: 44 (1979); Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980); 美国专利 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 或美国专利复审 30,985。任何这些培养基可根据需要补充激素和/或其它生长因子 (诸如胰岛素、运铁蛋白或表皮生长因子)、盐 (诸如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲剂 (诸如 HEPES)、核苷酸 (诸如腺苷和胸苷)、抗生素 (诸如 GENTAMYCIN™ 药物)、微量元素 (定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)、和葡萄糖或等效能源。还可以适宜浓度含有本领域技术人员知道的任何其它必需补充物。培养条件诸如温度、pH 等即为表达而选择的宿主细胞先前所用的, 这对于普通技术人员是显然的。

(ix) 抗体的纯化

在使用重组技术时, 可在细胞内生成抗体, 或者直接分泌到培养基中。如果在细胞内生成抗体, 那么首先需要通过例如离心或超滤清除微粒碎片, 或是宿主细胞或是裂解片段。如果抗体分泌到培养基中, 那么通常首先使用商品化蛋白质浓缩滤器 (例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤单元) 浓缩来自这些表达系统的上清液。可在任何上述步骤中包括蛋白酶抑制剂诸如 PMSF 以抑制蛋白水解, 而且可包括抗生素以防止外来污染物的生长。

可使用例如羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析 (优选的纯化技术是亲和层析) 来纯化从细胞制备的抗体组合物。蛋白 A 作为亲和配体的适宜性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白 Fc 结构域的种类和同种型。蛋白 A 可用于纯化基于人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、或 $\gamma 4$ 重链的抗体 (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。蛋白 G 推荐用于所有小鼠同种型和人 $\gamma 3$ (Guss et al., EMBO J. 5: 1567-1575 (1986))。亲和配体所附着的基质最常用的是琼脂糖, 但是可使用其它基质。物理稳定的基质诸如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯能获得比琼脂糖更快的流速和更短的加工时间。若抗体包含 C_{H3} 结构域, 则可使用 Bakerbond ABX™ 树脂 (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) 进行纯化。根据待回收的抗体, 也可使用其它蛋白质纯化技术诸如离子交换柱上的分馏、乙醇沉淀、反相 HPLC、硅土上的层析、肝素 SEPHAROSE™ 上

的层析、阴离子或阳离子交换树脂（诸如聚天冬氨酸柱）上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE 和硫酸铵沉淀。

在任何初步纯化步骤之后，可将含有目的抗体和污染物的混合物进行低 pH 疏水相互作用层析，使用 pH 约 2.5-4.5 的洗脱缓冲液，优选在低盐浓度（如约 0-0.25M 盐）进行。

活性测定法

可通过本领域知道的多种测定法对本发明的抗体鉴定它们的物理/化学特性和生物学功能。

可通过一系列测定法进一步鉴定纯化的免疫球蛋白，包括但不限于 N 端测序、氨基酸分析、非变性大小排阻高压液相层析(HPLC)、质谱、离子交换层析和木瓜蛋白酶消化。

在本发明的某些实施方案中，对本文在生成的免疫球蛋白分析它们的生物学活性。在有些实施方案中，对本发明的免疫球蛋白测试它们的抗原结合活性。本领域知道的且可用于本文的抗原结合测定法包括但不限于使用诸如 Western 印迹、放射免疫测定法、ELISA（酶联免疫吸附测定法）、“三明治”免疫测定法、免疫沉淀测定法、荧光免疫测定法和蛋白 A 免疫测定法等技术的任何直接或竞争性结合测定法。下文在实施例部分中提供了例示性的抗原结合测定法。

在一个实施方案中，本发明设想了具有一些但非所有效应物功能的改良抗体，这使得它在抗体体内半衰期是重要的但某些效应物功能（诸如补体和 ADCC）是不必要的或有害的许多应用中成为期望的候选物。在某些实施方案中，测量所生成免疫球蛋白的 Fc 活性以确保只保留了期望的特性。可进行体外和/或体内细胞毒性测定法以确认 CDC 和/或 ADCC 活性的降低/消减。例如，可进行 Fc 受体(FcR)结合测定法以确认抗体缺乏 FcγR 结合（因此有可能缺乏 ADCC 活性）但保留 FcRn 结合能力。介导 ADCC 的主要细胞，NK 细胞，只表达 FcγRIII，而单核细胞表达 FcγRI、FcγRII 和 FcγRIII。Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991)第 464 页表 3 总结了造血细胞上的 FcR 表达。美国专利 5,500,362 或 5,821,337 中记载了用于评估目的分子的 ADCC 活性的体外测定法的实例。可用于此类测定法的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。或者/另外，可在体

内评估目的分子的 ADCC 活性，如在动物模型中，诸如 Clynes et al., PNAS (USA) 95: 652-656 (1998)中所公开的。还可进行 C1q 结合测定法以确认抗体不能结合 C1q 且因此缺乏 CDC 活性。为了评估补体激活，可进行 CDC 测定法，例如如 Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996)中所述。还可使用本领域知道的方法进行 FcRn 结合和体内清除/半衰期测定。

人源化抗体

本发明涵盖人源化抗体。本领域知道用于人源化非人抗体的多种方法。例如，人源化抗体可具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称为“输入”残基，它们通常取自“输入”可变区。基本上可遵循 Winter 及其同事的方法进行人源化 (Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239: 1534-1536 (1988)), 即用非人高变区序列替代人抗体的对应序列。因此，此类“人源化”抗体是嵌合抗体 (美国专利 4,816,567), 其中显著少于完整的人可变区用非人物种的相应序列替代。在实践中，人源化抗体通常是如下人抗体，其中有些高变区残基和可能的有些 FR 残基用啮齿类抗体类似位点的残基替代。

用于制备人源化抗体的人轻链和重链可变区的选择对于降低抗原性是非常重要的。依照所谓的“最适(best-fit)”方法，用啮齿类抗体的可变区序列对已知人可变区序列的整个文库进行筛选。然后选择与啮齿类最接近的人序列作为人源化抗体的人框架 (Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901 (1987))。另一种方法使用由特定轻链或重链亚类(subgroup)的所有人抗体的共有序列衍生的特定框架。相同框架可用于几种不同的人源化抗体 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151: 2623 (1993))。

更为重要的是，抗体在人源化后保留对抗原的高亲和力和其它有利的生物学特性。为了达到此目的，依照一种方法，通过使用亲本序列和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的过程来制备人源化抗体。通常可获得免疫球蛋白三维模型，这是本领域技术人员所熟悉的。还可获得图解和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。通过检查这些显示图像能分析残基在候选免疫球蛋白序列发

挥功能中的可能作用，即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样，可以从受体序列和输入序列中选出 FR 残基并组合，从而得到期望的抗体特征，诸如对靶抗原的亲合力升高。一般而言，高变区残基直接且最实质的牵涉对抗原结合的影响。

抗体变体

一方面，本发明提供了在构成 Fc 区的 Fc 多肽界面中包含修饰的抗体，其中该修饰推动和/促进异二聚化。这些修饰包括将突起导入第一 Fc 多肽和将腔导入第二 Fc 多肽，其中突起可位于腔中，从而促进第一和第二 Fc 多肽的复合。本领域知道生成具有这些修饰的抗体的方法，例如美国专利 5,731,168 中所述。

在有些实施方案中，设想了本文所述抗体的氨基酸序列修饰。例如，可能希望改进抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。抗体的氨基酸序列变体是通过将适宜的核苷酸变化引入抗体核酸或通过肽合成制备的。此类修饰包括例如抗体氨基酸序列内的残基删除和/或插入和/或替代。进行任何删除、插入和替代组合以获得最终的构建物，倘若最终的构建物具有期望的特征。可在制备序列时将氨基酸改变引入受试抗体氨基酸序列。

可用于鉴定抗体中作为优选诱变位置的某些残基或区域的方法有“丙氨酸扫描诱变”，如 Cunningham and Wells, *Science* 244: 1081-1085 (1989) 中所述。这里，鉴定一个残基或一组靶残基（如带电荷的残基，诸如精氨酸、天冬氨酸、组氨酸、赖氨酸和谷氨酸）并用中性或带负电荷的氨基酸（最优选丙氨酸或多聚丙氨酸）替代，以影响氨基酸与抗原的相互作用。然后通过在对替代位点引入更多或其它变体，推敲对替代展示功能敏感性的氨基酸位置。由此，尽管用于引入氨基酸序列变异的位点是预先决定的，然而突变本身的本质不必预先决定。例如，为了分析指定位点处突变的后果，在靶密码子或区域进行丙氨酸扫描或随机诱变，并对所表达免疫球蛋白筛选期望的活性。

氨基酸序列插入包括氨基和/或羧基末端的融合，长度范围由一个残基至包含上百或更多残基的多肽，以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有 N 端甲硫氨酰残基的抗体或与细胞毒性多肽融合的抗体。抗体分子的其它插入变体包括将抗体的 N 或 C 端与酶（如用于

ADEPT) 或延长抗体血清半衰期的多肽融合。

另一类变体是氨基酸替代变体。这些变体在抗体分子中有至少一个氨基酸残基用不同残基替代。最有兴趣进行替代诱变的位点包括高变区，但是也设想了FR改变。表1中“优选替代”栏显示了保守替代。如果此类替代导致生物学活性变化，那么可导入表1中称为“例示替代”的更实质变化，或如下文参照氨基酸分类进一步所述，并筛选产物。

表1

原始残基	例示替代	优选替代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

对抗体生物学特性的实质性修饰可通过选择对维持以下方面的效果差

异显著的替代来实现: (a) 替代区域中多肽主链的结构, 例如(折叠)片或螺旋构象, (b) 靶位点处分子的电荷或疏水性, 或(c) 侧链的体积。根据其侧链特性的相似性, 氨基酸可如下分组 (A. L. Lehninger, 《Biochemistry》, 第2版, 第73-75页, Worth Publishers, New York, 1975):

- (1) 非极性的: Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M)
- (2) 不带电荷、极性的: Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q)
- (3) 酸性的: Asp (D)、Glu (E)
- (4) 碱性的: Lys (K)、Arg (R)、His (H)

或者, 根据共同的侧链特性, 天然发生残基可如下分组:

- (1) 疏水性的: 正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;
- (2) 中性、亲水性的: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;
- (3) 酸性的: Asp、Glu;
- (4) 碱性的: His、Lys、Arg;
- (5) 影响链取向的残基: Gly、Pro;
- (6) 芳香族的: Trp、Tyr、Phe。

非保守替代需要用这些类别之一的成员替换另一个类别的。还可将此替代残基引入保守替代位点, 或者更优选的是引入剩余(非保守)位点。

一类替代变体牵涉替代亲本抗体(例如人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常, 选择用于进一步开发的所得变体相对于产生它们的亲本抗体将具有改进的生物学特性。用于生成此类替代变体的一种便利方法牵涉使用噬菌体展示的亲合力成熟。简而言之, 将数个高变区位点(例如6-7个位点)突变, 在各个位点产生所有可能的氨基酸替代。如此生成的抗体展示在丝状噬菌体颗粒上, 作为与各个颗粒内包装的M13基因III产物的融合物。然后如本文所公开的对噬菌体展示的变体筛选其生物学活性(例如结合亲和力)。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点, 可进行丙氨酸扫描诱变以鉴定对抗原结合具有重要贡献的高变区残基。或者/另外, 分析抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体和抗原之间的接触点可能是有益的。所述接触残基及邻近残基是依照本文详述的技术进行替代的候选位点。一旦产生这样的变体, 如本文所述对该组变体进行筛选, 可选择在一种或多种

相关测定法中具有优良特性的抗体用于进一步的开发。

编码抗体氨基酸序列变体的核酸分子可通过本领域知道的多种方法来制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离（在天然发生氨基酸序列变体的情况中），或者通过对较早制备的变体或非变异型式的抗体进行寡核苷酸介导的（或定点）诱变、PCR 诱变和盒式诱变来制备。

可能希望在本发明免疫球蛋白多肽的 Fc 区中引入一处或多处氨基酸修饰，由此生成 Fc 区变体。Fc 区变体可包括在一个或多个氨基酸位置（包括铰链半胱氨酸）包含氨基酸修饰（如替代）的人 Fc 区序列（如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 Fc 区）。

依照此描述和本领域的教导，设想了在有些实施方案中，本发明方法中所使用的抗体与野生型对应抗体相比可在例如 Fc 区中包含一处或多处改变。与它们的野生型对应物相比，这些抗体仍将基本上保留治疗功效所需要的相同特性。例如，认为可在 Fc 区中进行将会导致 C1q 结合和/或补体依赖性细胞毒性（CDC）改变（即或是增强或是削弱）的某些改变，例如 WO99/51642 中所述。还可参见关注 Fc 区变体其它实例的 Duncan and Winter, Nature 322: 738-40 (1988); 美国专利 5,648,260; 美国专利 5,624,821; 及 WO94/29351。

免疫偶联物

本发明还关于包含偶联有细胞毒剂的抗体的免疫偶联物或抗体-药物偶联物(ADC)，所述细胞毒剂诸如化疗剂、药物、生长抑制剂、毒素（如细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素或其片段）或放射性同位素（即放射偶联物）。

抗体-药物偶联物在癌症治疗中用于局部投递毒害细胞剂或抑制细胞试剂（即用于杀死或抑制肿瘤细胞的药物）的用途（Syrigos and Epenetos, Anticancer Research 19: 605-614 (1999); Niculescu-Duvaz and Springer, Adv. Drg. Del. Rev. 26: 151-172 (1997); 美国专利 4,975,278）理论上能将药物部分靶向投递至肿瘤，并在那儿进行细胞内积累，而系统施用这些未经偶联的药物试剂可能在试图消除的肿瘤细胞以外导致不可接受的正常细胞的毒性水平（Baldwin et al., Lancet 603-05 (1986 年 5 月 15 日); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”，在《Monoclonal

Antibodies '84: Biological And Clinical Applications》中，A. Pinchera 等人编，第 475-506 页，1985)。由此试图获得最大功效及最小毒性。多克隆抗体和单克隆抗体皆有报道可用于这些策略 (Rowland et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 21: 183-87 (1986))。这些方法中所使用的药物包括道诺霉素 (daunomycin)、多柔比星 (doxorubicin)、甲氨蝶呤 (methotrexate) 和长春地辛 (vindesine) (Rowland et al., 1986, 见上文)。抗体-毒素偶联物中所使用的毒素包括细菌毒素诸如白喉毒素、植物毒素诸如蓖麻毒蛋白、小分子毒素诸如格尔德霉素 (geldanamycin) (Mandler et al., *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581 (2000); Mandler et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028 (2000); Mandler et al., *Bioconjugate Chem.* 13: 786-791 (2002))、美登木素生物碱类 (EP 1391213; Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623 (1996))、和加利车霉素 (Lode et al., *Cancer Res.* 58: 2928 (1998); Hinman et al., *Cancer Res.* 53: 3336-3342 (1993))。毒素可通过包括微管蛋白结合、DNA 结合或拓扑异构酶抑制在内的机制发挥其毒害细胞和抑制细胞的效果。有些细胞毒药物在与大的抗体或蛋白质受体配体偶联时趋于失活或活性降低。

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idex) 是由针对在正常和恶性 B 淋巴细胞表面上发现的 CD20 抗原的鼠 IgG1 κ 单克隆抗体与通过硫脲接头-整合剂所结合的 ^{111}In 或 ^{90}Y 放射性同位素构成的抗体-放射性同位素偶联物 (Wiseman et al., *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7): 766-77 (2000); Wiseman et al., *Blood* 99(12): 4336-42 (2002); Witzig et al., *J. Clin. Oncol.* 20(10): 2453-63 (2002); Witzig et al., *J. Clin. Oncol.* 20(15): 3262-69 (2002))。尽管 ZEVALIN 具有针对 B 细胞非何杰金氏 (Hodgkin) 淋巴瘤 (NHL) 的活性，然而施药在大多数患者中导致严重且长时间的血细胞减少。MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals)，即由人 CD33 抗体与加利车霉素连接而构成的抗体-药物偶联物，在 2000 年批准用于经注射治疗急性骨髓性白血病 (*Drugs of the Future* 25(7): 686 (2000); 美国专利 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001)。Cantuzumab mertansine (Immunogen Inc.)，即由 huC242 抗体经二硫化物接头 SPP 与美登木素生物碱药物部分 DM1 连接而构成的抗体-药物偶联物，正在进行用于治疗表达 CanAg 的癌症诸如结肠癌、胰腺癌、胃癌和其它癌的 II 期试验。

MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), 即由抗前列腺特异膜抗原(PSMA)单克隆抗体与美登木素生物碱药物部分 DM1 连接而构成的抗体-药物偶联物, 正在进行用于前列腺肿瘤潜在治疗的开发。将多拉司他汀(dolastatin)的合成类似物 auristatin 肽、auristatin E (AE)和单甲基 auristatin (MMAE)与嵌合单克隆抗体 cBR96 (对癌上的 Lewis Y 特异)和 cAC10 (对恶性血液肿瘤上的 CD30 特异)偶联 (Doronina et al., Nature Biotechnology 21(7): 778-784 (2003)), 且也正在进行治疗性开发。用作药物缀合物细胞毒剂的其它化合物包括而限于 auristatin E (AE)、MMAF (药物 C-末端上带有苯丙氨酸的 auristatin E (MMAE) 变体)、和 AEVB (auristatin E 戊酰苄基脒(valeryl benzylhydrazone), 通过 AE 的 C-末端的酸不稳定性接头连接)。用于将药物连上抗体的缀合物接头包括而限于 MC (马来酰亚胺己酰基(maleimidocaproyl)、Val Cit (缬氨酸-瓜氨酸, 蛋白酶裂解接头中的二肽位点)、瓜氨酸 (2-氨基-5-脲基戊酸)、PAB (p-氨基苄基氨基甲酰基, 接头的“自毁(self-immolative)”部分)、Me (N-甲基-缬氨酸瓜氨酸, 其中接头肽键经修饰能防止被组织蛋白酶 B 裂解)、MC(PEG)6-OH (马来酰亚胺己酰基-聚乙二醇, 连接于抗体半胱氨酸)、SPP (N-琥珀酰亚胺基 4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯), 和 SMCC (N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯)。这些和其它有用的药物缀合物和它们的制剂公开于诸如 Doronina, S.O.等, Nature Biotechnology 21: 778-794 (2003)中, 其全文纳入本文参考。尤其优选的接头分子包括如, N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯 (SPDP) (如参见, Carlsson 等, Biochem. J., 173, 723-737 (1978))、N-琥珀酰亚胺基 4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB) (如参见, 美国专利第 4, 563, 304 号)、N-琥珀酰亚胺基 4-(2-吡啶基二硫代)戊酸酯(SPP) (如参见, CAS 登录号 341498-08-6)、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC) (如参见, Yoshitake 等, Eur. J. Biochem., 101, 395-399 (1979))、和 N-琥珀酰亚胺基 4-甲基-4-[2-(5-硝基-吡啶基)-二硫代]戊酸酯(SMNP) (如参见, 美国专利第 4, 563, 304 号)。

上文已经描述了可用于生成此类免疫偶联物的化疗剂。可使用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链 (来自铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*)、蓖麻毒蛋白(ricin) A 链、相思豆毒蛋白(abrin) A 链、蒴莲根毒蛋白(modeccin) A 链、 α -帚曲霉素

(sarcin)、油桐(*Aleutites fordii*)毒蛋白、香石竹(*dianthin*)毒蛋白、美洲商陆(*Phytolaca americana*)毒蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制物、麻疯树毒蛋白(*curcin*)、巴豆毒蛋白(*crotonin*)、肥皂草(*sapaonaria officinalis*)抑制物、白树毒蛋白(*gelonin*)、丝林霉素(*mitogellin*)、局限曲菌素(*restrictocin*)、酚霉素(*phenomycin*)、依诺霉素(*enomycin*)和单端孢菌素(*trichothecenes*)。多种放射性核素可用于生成放射偶联抗体。实例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。抗体和细胞毒剂的偶联物可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备,诸如N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯(诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)己二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。例如,可如Vitetta et al., *Science* 238: 1098 (1987)中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂。参见WO 94/11026。

本文还设想了抗体与一种或多种小分子毒素诸如加利车霉素(*calicheamicin*)、美登木素生物碱类(*maytansinoids*)、单端孢霉素(*trichothecene*)和CC1065及这些毒素具有毒素活性的片段的偶联物。

美登素和美登木素生物碱类

在一个实施方案中,本发明的抗体(全长或片段)与一个或多个美登木素生物碱分子偶联。

美登木素生物碱类是通过抑制微管蛋白多聚化来发挥作用的有丝分裂抑制剂。美登素最初从东非灌木齿叶美登木(*Maytenus serrata*)分离得到(美国专利3,896,111)。随后发现某些微生物也生成美登木素生物碱类,诸如美登醇和C-3美登醇酯(美国专利4,151,042)。例如下列美国专利公开了合成美登醇及其衍生物和类似物: 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 及4,371,533,明确将其公开内容收入本文作为参考。

美登木素生物碱-抗体偶联物

在改进其治疗指数的尝试中，已经将美登素和美登木素生物碱类与特异结合肿瘤细胞抗原的抗体偶联。例如下列专利公开了包含美登木素生物碱类的免疫偶联物及其治疗用途：美国专利 5,208,020; 5,416,064; 及欧洲专利 EP 0 425 235 B1，明确将其公开内容收入本文作为参考。Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996)记载了包含与针对人结肠直肠癌的单克隆抗体 C242 连接的称为 DM1 的美登木素生物碱的免疫偶联物。发现该偶联物具有针对培养的结肠癌细胞的高度细胞毒性，而且在体内肿瘤生长测定法中显示抗肿瘤活性。Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992)记载了其中美登木素生物碱经二硫化物接头与结合人结肠癌细胞系上抗原的鼠抗体 A7 或结合 HER-2/neu 癌基因的另一种鼠单克隆抗体 TA.1 偶联的免疫偶联物。在体外在人乳癌细胞系 SK-BR-3 上测试了 TA.1-美登木素生物碱偶联物的细胞毒性，该细胞系每个细胞表达 3×10^5 个 HER-2 表面抗原。药物偶联物达到了与游离美登木素生物碱药物相似的一定程度的细胞毒性，这可通过增加每个抗体分子偶联的美登木素生物碱分子数目来提高。A7-美登木素生物碱偶联物在小鼠中显示低系统性细胞毒性。

抗体-美登木素生物碱偶联物（免疫偶联物）

抗体-美登木素生物碱偶联物可通过将抗体与美登木素生物碱分子化学连接且不显著削弱抗体或美登木素生物碱分子的生物学活性来制备。每个抗体分子偶联平均 3-4 个美登木素生物碱分子在增强针对靶细胞的细胞毒性中显示功效，且对抗体的功能或溶解度没有负面影响，尽管预计甚至一个分子的毒素/抗体也将较之裸抗体的使用增强细胞毒性。美登木素生物碱类在本领域是众所周知的，而且可通过已知技术合成或从天然来源分离。例如美国专利 5,208,020 和上文提及的其它专利及非专利发表物中公开了合适的美登木素生物碱类。优选的美登木素生物碱类是美登醇和美登醇分子的芳香环或其它位置经过修饰的美登醇类似物，诸如各种美登醇酯。

本领域知道许多连接基团可用于制备抗体-美登木素生物碱偶联物，包括例如美国专利 5,208,020 或欧洲专利 0 425 235 B1 及 Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992)中所公开的。连接基团包括二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团、或酯酶不稳定基团，正如上文所述专利中所公开的，优选二硫化物和硫醚基团。

可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和美登木素生物碱的偶联

物, 诸如 N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯(诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯 2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。特别优选的偶联剂包括 N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP) (Carlsson et al., *Biochem. J.* 173: 723-737 (1978)) 和 N-琥珀酰亚氨基-4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP), 由此提供二硫键连接。

根据连接的类型, 可将接头附着于美登木素生物碱分子的多个位置。例如, 可使用常规偶联技术通过与羟基的反应来形成酯键。反应可发生在具有羟基的 C-3 位置、经羟甲基修饰的 C-14 位置、经羟基修饰的 C-15 位置、和具有羟基的 C-20 位置。在一个优选的实施方案中, 在美登醇或美登醇类似物的 C-3 位置形成键连接。

加利车霉素

另一种感兴趣的免疫偶联物包含与一个或多个加利车霉素分子偶联的抗体。加利车霉素抗生素家族能够在亚皮摩尔浓度生成双链 DNA 断裂。关于加利车霉素家族偶联物的制备参见美国专利 5,712,374; 5,714,586; 5,739,116; 5,767,285; 5,770,701; 5,770,710; 5,773,001; 5,877,296 (都授予美国 Cyanamid 公司)。可用的加利车霉素结构类似物包括但不限于 γ_1^1 、 α_2^1 、 α_3^1 、N-乙酰基- γ_1^1 、PSAG 和 θ_1^1 (Hinman et al., *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993); Lode et al., *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998); 及上述授予美国 Cyanamid 公司的美国专利)。可与抗体缀合的另一种抗肿瘤药物是 QFA, 它是一种抗叶酸药物。加利车霉素和 QFA 都具有胞内作用位点, 且不易穿过质膜。因此, 这些试剂经由抗体介导的内在化的细胞摄取大大增强了它们的细胞毒效果。

其它细胞毒剂

可与本发明抗体偶联的其它抗肿瘤剂包括 BCNU、链佐星(streptozocin)、长春新碱(vincristine)、5-氟尿嘧啶、美国专利 5,053,394、5,770,710 中记载的统称为 LL-E33288 复合物的试剂家族、及埃斯波霉素类(esperamicins) (美国专利 5,877,296)。

可用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链（来自铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*）、蓖麻毒蛋白(ricin) A 链、相思豆毒蛋白(abrin) A 链、蒴莲根毒蛋白(modeccin) A 链、 α -帚曲霉素(sarcin)、油桐(*Aleutites fordii*)毒蛋白、香石竹(dianthin)毒蛋白、美洲商陆(*Phytolaca americana*)毒蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制物、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(crocin)、肥皂草(*sapaonaria officinalis*)抑制物、白树毒蛋白(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)和单端孢菌素(trichothecenes)。参见例如 1993 年 10 月 28 日公布的 WO 93/21232。

本发明还设想了抗体和具有核酸降解活性的化合物（如核糖核酸酶或 DNA 内切核酸酶，诸如脱氧核糖核酸酶；DNA 酶）之间形成的免疫偶联物。

为了选择性破坏肿瘤，抗体可包含高度放射性原子。多种放射性同位素可用于生成放射偶联抗体。实例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 和 Lu 的放射性同位素。在将偶联物用于检测时，可包含放射性原子用于闪烁照相研究，例如 Tc^{99m} 或 I^{123} ，或是包含自旋标记物用于核磁共振 (NMR) 成像（也称为磁共振成像，mri），诸如碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

可以已知方式将放射性或其它标记物掺入偶联物。例如，可生物合成肽，或是通过化学氨基酸合成法合成肽，其中使用牵涉例如氟-19 代替氢的合适氨基酸前体。可经肽中的半胱氨酸残基来附着标记物，诸如 Tc^{99m} 或 I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 和 In^{111} 。可以经赖氨酸残基来附着钇-90。IODOGEN 法 (Fraker et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57 (1978)) 可用于掺入碘-123。

《Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy》(Chatal, CRC Press, 1989) 详细记载了其它方法。

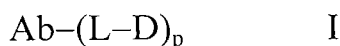
可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和细胞毒剂的偶联物，诸如 N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯（诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯）、活性酯类（诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯）、醛类（诸如戊二醛）、双叠氮化合物（诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺）、双重氮衍生物（诸如双(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺）、二异硫氰酸酯（诸如甲苯

2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。例如,可如 Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987)中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14 标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂。参见 WO94/11026。接头可以是便于在细胞中释放细胞毒药物的“可切割接头”。例如,可使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、光不稳定接头、二甲基接头、或含二硫化物接头(Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992); 美国专利 5,208,020)。

本发明的化合物明确涵盖但不限于用下列交联剂制备的 ADC: 商品化(如购自 Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, U.S.A.)的 BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、sulfo-EMCS、sulfo-GMBS、sulfo-KMUS、sulfo-MBS、sulfo-SIAB、sulfo-SMCC 和 sulfo-SMPB、和 SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基砜)苯甲酸酯)。见 2003-2004 年度应用手册和产品目录(Applications Handbook and Catalog)第 467-498 页。

抗体-药物偶联物的制备

在本发明的抗体-药物偶联物(ADC)中,将抗体(Ab)经接头(L)与一个或多个药物部分(D)缀合,例如每个抗体偶联约 1 个至约 20 个药物部分。可采用本领域技术人员知道的有机化学反应、条件和试剂通过数种路径来制备通式 I 的 ADC,包括:(1)抗体的亲核基团经共价键与二价接头试剂反应,形成 Ab-L,随后与药物部分 D 反应;和(2)药物部分的亲核基团经共价键与二价接头试剂反应,形成 D-L,随后与抗体的亲核基团反应。



抗体的亲核基团包括但不限于:(i) N 末端氨基;(ii) 侧链氨基,如赖氨酸;(iii) 侧链巯基,如半胱氨酸;和(iv) 糖基化抗体中糖的羟基或氨基。氨基、巯基、和羟基是亲核的,能够与接头部分上的亲电子基团反应而形成共价键,而接头试剂包括:(i) 活性酯类,诸如 NHS 酯、HOBt 酯、卤代甲酸酯、和酸性卤化物;(ii) 烷基和苯甲基卤化物,诸如卤代乙酰胺;(iii) 醛类、酮类、羧基和马来酰亚胺基团。某些抗体具有可还原的链间二硫键,即半胱氨酸桥。可通过还原剂诸如 DTT(二硫苏糖醇)处理使抗体具有与接头试剂缀合的反应活性。每个半胱氨酸桥理论上将形成两个反应性硫醇

亲核体。可经由赖氨酸与 2-亚氨基硫烷 (Traut 氏试剂) 的反应, 导致胺转变为硫醇, 从而将额外亲核基团引入抗体。

还可通过修饰抗体来生成本发明的抗体-药物偶联物, 即引入可与接头试剂或药物上的亲核取代基反应的亲电子部分。可用例如高碘酸盐氧化剂氧化糖基化抗体的糖, 从而形成可与接头试剂或药物部分的胺基团反应的醛或酮基团。所得亚胺 Schiff 碱基可形成稳定的键, 或者可用例如硼氢化物试剂还原而形成稳定的胺连接。在一个实施方案中, 糖基化抗体的碳水化合物部分与半乳糖氧化酶或偏高碘酸钠的反应可在蛋白质中生成羰(醛和酮)基团, 它可与药物上的适宜基团反应 (Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一个实施方案中, 包含 N 末端丝氨酸或苏氨酸残基的蛋白质可与偏高碘酸钠反应, 导致在第一个氨基酸处生成醛 (Geoghegan & Stroh, Bioconjugate Chem. 3: 138-146 (1992); US 5362852)。此类醛可与药物部分或接头亲核体反应。

同样, 药物部分上的亲核基团包括但不限于: 胺、硫醇、羟基、酰肼、肟、肼、缩氨基硫脲、肼羧酸酯、和芳基酰肼基团, 它们能够与接头部分上的亲电子基团反应而形成共价键, 而接头试剂包括: (i) 活性酯类, 诸如 NHS 酯、HOBt 酯、卤代甲酸酯、和酸性卤化物; (ii) 烷基和苯甲基卤化物, 诸如卤代乙酰胺; (iii) 醛类、酮类、羧基、和马来酰亚胺基团。

或者, 可通过例如重组技术或肽合成来制备包含抗体和细胞毒剂的融合蛋白。DNA 的长度可包含各自编码偶联物两个部分的区域, 或是彼此毗邻或是由编码接头肽的区域分开, 该接头肽不破坏偶联物的期望特性。

在又一个实施方案中, 可将抗体与“受体”(诸如链霉亲和素)偶联从而用于肿瘤预先靶向, 其中对患者施用抗体-受体偶联物, 接着使用清除剂由循环中清除未结合的偶联物, 然后施用与细胞毒剂(如放射性核苷酸)偶联的“配体”(如亲合素)。

抗体衍生物

可进一步修饰本发明的抗体以包含本领域知道的且易于获得的额外非蛋白质性质部分。优选的是, 适于抗体衍生化的部分是水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、右旋糖苷、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧

戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或随机共聚物)、和右旋糖苷或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。由于其在水中的稳定性,聚乙二醇丙醛在生产中可能具有优势。聚合物可以是任何分子量,而且可以是分支的或不分支的。附着到抗体上的聚合物数目可以变化,而且如果附着了超过一个聚合物,那么它们可以是相同或不同的分子。一般而言,可根据下列考虑来确定用于衍生化的聚合物的数目和/或类型,包括但不限于待改进抗体的具体特性或功能、抗体衍生物是否将用于指定条件下的治疗等。

药用配制剂

可通过将具有期望纯度的抗体与任选的生理学可接受载体、赋形剂或稳定剂混合来制备包含本发明抗体的治疗用配制剂,以水溶液、冻干或其它干燥剂型的形式贮存(《Remington's Pharmaceutical Sciences》,第16版,Osol,A.编,1980)。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,而且包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化己烷双胺;苯扎氯铵、苯索氯铵;酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖类,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐相反离子,诸如钠;金属复合物(如Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂,诸如TWEEN™、PLURONIC™或聚乙二醇(PEG)。

本文中的配制剂还可含有超过一种所治疗具体适应症所必需的活性化合物,优选活性互补且彼此没有不利影响的。合适的是,此类分子以对于预定目的有效的量组合。

活性成分还可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中(例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)。

在胶状药物传递系统中（例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊）、或在粗滴乳状液中。此类技术公开于例如《Remington's Pharmaceutical Sciences》，第16版，Osol,A.编，1980。

用于体内施用的配制剂必须是无菌的。这可容易的通过使用无菌滤膜过滤来实现。

可制备持续释放配制剂。持续释放配制剂的合适例子包括含有本发明免疫球蛋白的固体疏水性聚合物半透性基质，该基质以定型产品的形式存在，如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶（例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇)）、聚交酯（美国专利 3,773,919）、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如 LUPRON DEPOT™（由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体）及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然诸如乙烯-乙酸乙烯和乳酸-乙醇酸等聚合物能够持续释放分子 100 天以上，但是某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。当胶囊化抗体在体内长时间维持时，它们可能由于暴露于 37°C 的潮湿环境而变性或聚集，导致生物学活性损失和免疫原性可能改变。可根据相关机制来设计合理的稳定化策略。例如，如果发现聚集机制是经由硫醇-二硫化物互换而形成分子间 S-S 键，那么可通过修饰巯基残基、由酸性溶液冻干、控制湿度、采用适宜添加剂和开发特定的聚合物基质组合物来实现稳定。

应用

本发明的抗体可例如用于体外、离体和体内的治疗方法中。本发明的抗体可用作拮抗剂在体外、离体和/或体内来部分或完全阻断特异抗原的活性。另外，至少一些本发明抗体能中和其它物种的抗原活性。因此，如在含抗原的细胞培养物中、在带有与本发明的抗体交叉反应的抗原的人受试者或其它受试哺乳动物(如黑猩猩、狒狒、狨猴、猕猴和恒河猴、猪或小鼠)中，本发明的抗体可用于抑制特定抗原活性。在一个具体实施方式中，本发明的抗体可用于抑制抗原活性，其通过将抗体同抗原接触而抑制抗原活性。优选抗原是人蛋白质分子。

在一个具体实施方式中，本发明的抗体可用于在患病的受试者中抑制抗原的方法中，在所述疾病中所述抗原活性是有害的，所述方法包括向受

试者给药本发明的抗体，从而抑制受试者中的抗原活性。优选抗原是人蛋白质分子，而且受试者是人受试者。可选地，受试者可以是表达与本发明抗体结合的抗原的哺乳动物。更进一步，受试者可以是被导入了抗原的哺乳动物(如，通过给药抗原或通过表达抗原转基因)。为了治疗目的，本发明的抗体可给药于人受试者。另外，为了兽医目的或作为人疾病的动物模型，本发明的抗体可给药于表达与免疫球蛋白交叉反应的抗原的非人哺乳动物(如，灵长动物、猪或小鼠)。对于后者，这些动物模型可用于评估本发明的抗体的治疗功效(例如，测试给药剂量和给药时程)。例如，本发明的有治疗用途的阻断抗体包括但不限于，例如抗-HER2、抗-VEGF、抗-IgE、抗-CD11、抗-干扰素和抗-组织因子的抗体。本发明的抗体可用于治疗、抑制、延缓进程、阻止/延缓复发、改善、或防止与一个或多个抗原分子的异常表达和/或活性相关的疾病、病症或状态，其包括但不限于恶性和良性肿瘤；非白血病和淋巴性恶性肿瘤；神经元、神经胶质、星形胶质细胞、下丘脑和其它腺体、巨噬细胞、上皮、间质和囊胚腔疾病；和炎性、血管发生性和免疫性疾病。

在一个方面，本发明的阻断抗体特异于配体抗原，并通过阻断或干扰涉及配体抗原的配体-受体相互作用来抑制抗原活性，由此抑制相应信号途径和其它分子或细胞事件。本发明也特别公开了受体特异性抗体，其不必阻止配体结合但干扰受体活化，由此抑制任何通常由配体结合而启动的应答。本发明还涵盖抗体，其优选地或专门地结合于配体-受体复合物。本发明的抗体也可用作特定抗原受体的激动剂，由此加强、增进或活化配体介导的受体活化作用的全部或部分活性。

在某些实施方案中，将包含与细胞毒剂偶联的抗体的免疫偶联物施用于患者。在有些实施方案中，免疫偶联物和/或它所结合的抗原由细胞内在化，导致免疫偶联物杀伤它所结合的靶细胞的治疗功效提高。在一个实施方案中，细胞毒剂靶向或干扰靶细胞中的核酸。此类细胞毒剂的实例包括本文所述任何化疗剂(诸如美登木素生物碱或加利车霉素)、放射性同位素、或核糖核酸酶或DNA内切核酸酶。

在治疗中，本发明的抗体可单独使用，或是联合其它组合物。例如，本发明的抗体可与另一种抗体、化疗剂(包括化疗剂混合物)、其它细胞毒剂、抗血管发生剂、细胞因子、和/或生长抑制剂联合施用。当本发明的抗

体抑制肿瘤生长时，可能特别希望将其联合一种或多种同样抑制肿瘤生长的其它治疗剂。例如，在治疗方案中，如治疗本文所述的任何疾病，包括结肠直肠癌、转移性乳腺癌和肾癌，本发明的抗体可与抗-VEGF 抗体(如，AVASTIN)和/或抗-ErbB 抗体 (如 HERCEPTIN[®] 抗-HER2 抗体) 一起联用。或者/另外，患者可接受联合放射疗法 (如外部射束照射或使用放射性标记药剂诸如抗体的疗法)。上文所述此类联合疗法包括联合施药 (当相同或分开配制剂中包含两种或多种药剂时) 和分开施药，在后一种情况中，本发明抗体的施用可发生在附属疗法的施用之前和/或之后。

可通过任何合适手段来施用本发明的抗体 (和附属治疗剂)，包括肠胃外、皮下、腹膜内、肺内和鼻内，以及损伤内 (如果希望局部治疗的话) 施用。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。另外，脉冲输注抗体也是合适的，特别是抗体剂量衰减时。可通过任何合适路径服药，例如通过注射，诸如静脉内或皮下注射，这部分取决于施药是短期的还是长期的。

可以与优良医学实践一致的方式配制、剂量给药和施用本发明的抗体组合物。在此内容中考虑的因素包括所治疗的具体紊乱、所治疗的具体哺乳动物、患者个体的临床状况、紊乱的起因、投递药剂的部位、施药的方法、施药的日程安排、和医学从业人员知道的其它因素。不是必需而是任选将抗体与目前用于预防或治疗所讨论紊乱的一种或多种药剂一起配制。此类其它药剂的有效量取决于配制剂中存在的本发明抗体的量、紊乱或治疗的类型、和上文讨论的其它因素。这些通常是以与上文所用相同剂量和施用路径使用，或是迄今所用剂量的大约 1-99%。

对于疾病的预防或治疗，本发明抗体的适宜剂量 (在单独使用或联合其它药剂诸如化疗剂时) 将取决于待治疗疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重程度和进程、施用抗体是出于预防还是治疗目的、先前的疗法、患者的临床病史和对抗体的响应、及主治医师的判断。合适的是，一次性或通过一系列治疗将抗体施用于患者。根据疾病的类型和严重程度，施用于患者的初始候选剂量是约 1 μ g/kg 至 15mg/kg (如 0.1mg/kg-10mg/kg) 抗体，例如或是通过一次或多次分开施药或是通过连续输注。根据上文所述因素，典型日剂量的范围可以是约 1 μ g/kg 至 100mg/kg 或更多。对于持续数天或更长的重复施药，根据状况，持续治疗直至疾病症状发生期望的遏制。抗体

的例示剂量的范围可以是约 0.05mg/kg 至约 10mg/kg。由此，可对患者施用约 0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg 或 10mg/kg（或其任意组合）的一剂或多剂。这些剂量可间歇施用，例如每周或每三周（例如使得患者接受约 2 剂至约 20 剂，例如约 6 剂抗体）。可施用一剂较高的初始加载剂量，后续一剂或多剂较低剂量。例示性剂量给药方案包括施用一剂约 4mg/kg 抗体的初始加载剂量，后续每周一剂约 2mg/kg 的维持剂量。然而，其它剂量方案也可能是有用的。这种疗法的进程易于通过常规技术和测定法来监测。

制品

在本发明的另一个方面，提供了包含可用于治疗、预防和/或诊断上文所述紊乱的物质的制品。制品包括容器和贴在所述容器上或与其相关的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶子、小管、注射器等。容器可用各种材料制成，诸如玻璃或塑料。容器中装有其自身或在联合其它组合物时有效治疗、预防和/或诊断疾患的组合物，而且可具有无菌存取口（例如容器可以是具有皮下注射针头可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小管）。组合物中的至少一种活性剂是本发明的抗体。标签或包装插页指示该组合物用于治疗选择的疾患，诸如癌症。此外，制品可包括(a)其中装有组合物的第一容器，其中所述组合物包含本发明的抗体；和(b)其中装有组合物的第二容器，其中所述组合物包含其它细胞毒剂。本发明此实施方案中的制品还可包括指示第一和第二抗体组合物可用于治疗特定疾患如癌症的包装插页。或者/另外，制品还可包括第二（或第三）容器，其中装有制药学可接受的缓冲剂，诸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏(Ringer)溶液和右旋糖溶液。它还可包括商业和用户立场上所需的其它物质，包括其它缓冲剂、稀释剂、滤器、针头和注射器。

以下是本发明方法和组合物的实施例。根据以上提供的概括说明，可理解可以实施各种其它的具体实施方式。

实施例

本文的实施例描述了从与 $\alpha 4\beta 7$ 整联蛋白 $\beta 7$ 亚基结合的大鼠抗-小鼠抗体中产生人源化抗- $\beta 7$ 抗体。

实施例 1: β 7 拮抗剂抗体的人源化

材料和方法

残基编号是根据 Kabat (Kabat 等, *Sequences of Proteins of immunological interest*, 第 5 版, 公共卫生部, 国家卫生研究院, Bethesda, MD (1991)) 确定的。使用单字母的氨基酸缩写。利用 IUB 编码(N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B = C/G/T, H = A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W = A/T, Y = C/T)来表示 DNA 兼并性。

受体人共有框架上的直接的高变区移植物 - 该工作所用的噬菌体 (pVO350-2b) 是单价 Fab-g3 展示载体, 其具有在 *phoA* 启动子控制下的 2 个开放阅读框, 其基本如 Lee 等, *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5): 1073-93 所述。第一个开放阅读框由与受体轻链的 VL 和 CH1 结构域融合的 *stII* 信号序列组成, 而第二个由与受体重链的 VH 和 CH1 结构域融合的 *stII* 信号序列组成, 其后接着截短型的小噬菌体衣壳蛋白 P3 (Lowman, H.等 (1990) *Biochemistry* 30: 10832)。

来自大鼠 Fib504 (抗体 FIB504.64 通过杂交瘤 ATCC HB-293 (美国典型培养物保藏中心 (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, 美国) 产生) 的 VL 和 VH 结构域能与人共有 κ I (huKI) 和人亚型 III 共有 VH (huIII) 结构域配对排列。为了制备高变区 (HVR) 移植物, 用以下框架: 对于轻链可变结构域框架, 使用 HuKI (参见图 1A 和 7)。对于重链可变结构域框架, 可用受体 VH 框架, 一种经修饰的人亚型 III (humIII) 共有 VH 结构域, 其在 3 个位置上与 humIII 序列有区别: R71A、N73T 和 L78A (参见 Carter 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 4285 (1992)) (参见图 1B)。在本发明抗体的产生过程中, 通过制备以下氨基酸替换也可从修饰的人亚型 III 共有 VH 结构域来制备 504K-RF 移植物: A71R 和 A78F。

通过基因工程将来自大鼠 Fib504 (由杂交瘤 ATCC HB-293 产生) 抗体的高变区插入受体人亚型 III 共有 VH 框架中, 来产生直接的 HVR 移植 (Fib504 移植) (参见图 1B)。在 VL 结构域中, 来自大鼠 Fib504 的以下区域移植到人共有受体 (huKI) 上: 第 24-34 位 (L1)、第 50-56 位 (L2) 和第 89-97 位 (L3) (图 1A)。在 VH 结构域中, 移植第 26-35 位 (H1)、第 49-65 位 (H2) 和第 94-102 位 (H3) (图 1B)。另外, 构建第二个 HVR 移植物 (graft) (Fib504K 移植物), 其也包括在 HVR 内, 根据 L2 的扩大定义, 其为 VL 第 49 位 (参

见 MacCallum 等 J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)). MacCallum 等分析了抗体和抗原复合物的晶体结构并发现了轻链的第 49 位和重链的第 49 和 94 位是抗原接触区域部分, 因而, 对于本文公开的人源化抗- β 7 抗体, 这些位置包括在 HVR-L2、HVR-H2 和 HVR-H3 的定义之中。

直接移植体变体(direct-graft variant)通过Kunkel突变(Kunkel等(1987)同上)利用针对每个高变区的各自寡聚核苷酸来产生。通过DNA测序来确定正确的克隆。

高变区的软随机化:

“软随机化(soft randomization)”过程 (参见 US 申请第 60/545, 840 号)指对选择的蛋白质序列(如抗体高变区)进行偏向性突变(biased mutagenesis)的过程。在每个所选位置上导入约百分之 10-50 的突变时, 该方法保持了对鼠、大鼠、或其它初始高变区序列的偏好。该技术增加了筛选所用的文库的容量, 并避免了在由抗体所识别的抗原表位方面出现改变。根据该软随机化技术, 利用对小鼠高变区序列保持偏好的策略, 可将序列多样性导入每个高变区中。这可利用毒化寡聚核苷酸合成策略(poisoned oligonucleotide synthesis strategy)来实现, 这最初由 Gallop 等, J. Med. Chem. 37: 1233-1251 (1994)所述。可是, 也可用对非人高变区残基保持偏好的其它方法, 如易错 PCR、DNA 改组等。

根据本文所用的方法, 对于要突变的高变区内的给定区域, 编码野生型氨基酸的密码子用核苷酸混合物 (例如 70-10-10-10 混合物)毒化, 导致在每个选择的高变区位置上有约百分之 50 的突变率。为了实现此, 用其它三种核苷酸低水平污染的混合物, 如 70-10-10-10 的核苷酸混合物, 来合成编码要突变的野生型高变区氨基酸的密码子。因而, 举例来说, 为了软随机化 PRO (CCG), 合成的第一个位置是含 70%的 C、和 G、T 和 A 各 10%的混合物; 第二个位置是含 70%的 C、和 A、G 和 T 各 10%的混合物; 而第三个位置是含 70%的 G、和 A、C 和 T 各 10%的混合物。根据在给定位置上合成的密码子、编码特定氨基酸的密码子数目、和由合成混合物的核苷酸组分毒化寡聚核苷酸合成的程度, 能够上或下调偏好, 这是可以理解的。

软随机化的寡聚核苷酸可仿照鼠、大鼠或其它初始高变区序列来进行, 而且其涵盖了直接的高变区移植物所限定的相同区域。可选地, 两个位置 (在 VH 结构域的 H2 和 H3 中的起始氨基酸) 的多样性可以是受限制的:

对于第 49 位, 用密码子 RGC 编码 A、G、S 或 T, 而在第 94 位, 用密码子 AKG 编码 M 或 R。

噬菌体文库的产生 - 在 6 个 20 μ l 的反应中分别磷酸化为每个高变区设计的随机寡聚核苷酸库, 所述反应包含 660 ng 寡聚核苷酸、pH 7.5 的 50 mM Tris、10 mM $MgCl_2$ 、1 mM ATP、20 mM DTT、和 5 U 多聚核苷酸激酶, 于 37°C 进行 1 小时。然后, 这 6 个磷酸化的寡聚核苷酸库与含 pH 7.5 的 50 mM Tris、10 mM $MgCl_2$ 的 20 μ g Kunkel 模板混合, 混合后的最终体积为 500 μ l, 而且使得寡聚核苷酸与模板之比为 3。在 90°C 退火混合物 4 分钟, 置于 50°C 5 分钟, 然后在冰上冷却。根据修改的规程, 用 QIAQUICK™ PCR 纯化试剂盒(Qiagen 试剂盒 28106, Qiagen, Valencia, CA)去除过量的未退火的寡聚核苷酸, 从而防止退火的 DNA 过量变性。向 500 μ l 退火了的混合物中加入 150 μ l 的 Qiagen 缓冲液 PB, 并用 2 个硅柱将混合物分离。用 750 μ l 的 Qiagen 缓冲液 PE 洗涤每个柱, 再离心甩干柱, 然后用 110 μ l pH 8 的 10 mM Tris、1 mM EDTA 溶液洗脱每个柱。然后于室温在 3 小时内加入 1 μ l 100mM ATP、10 μ l 25mM dNTP (dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 各 25mM)、15 μ l 100mM DTT、25 μ l 10X TM 缓冲液 (0.5 M Tris pH 7.5, 0.1 M $MgCl_2$)、2400 U T4 连接酶、和 30 U T7 聚合酶, 由此来扩增退火后清洗过的模板 (220 μ l)。

在 Tris-乙酸盐-EDTA/琼脂糖凝胶上分析该扩增产物(Sidhu 等, *Methods in Enzymology* 328: 333-363 (2000))。通常可看见 3 个条带: 底下的条带是正确填补并连接的产物, 中间的条带是填补但未连接的, 而顶上的条带是转移链。顶上的条带由 T7 聚合酶固有副活性(intrinsic side activity)产生并难以避免(Lechner 等, *J. Biol. Chem.* 258: 11174-11184 (1983)); 可是, 该条带转化效率要比底下的条带低 30 倍, 其通常几乎不对文库起作用。中间的条带是由于最后连接反应缺少 5'磷酸造成的; 该条带能有效转化并主要提供野生型序列。

然后清洗该补足产物(fill in product), 如 Sidhu 等, *Methods in Enzymology* 328: 333-363 (2000)所述, 以电穿孔使之转化入 SS320 细胞, 并在 M13/KO7 辅助噬菌体存在的条件下进行增殖。文库大小为 $1-2 \times 10^9$ 个独立的克隆。对来自最初文库的随机克隆进行测序, 由此评估文库质量。

噬菌体选择- 全长人整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 在 293 细胞中表达 (Graham 等, *J.*

Gen Virol. 36: 59 (1977)), 并通过 Fib504 亲和层析纯化, 用作噬菌体选择的靶位。为了固定在 MaxiSorp™微量滴定板(Nalge Nunc, Rochester, NY)上, 于 4 摄氏度用 150 mM NaCl、50 mM pH 7.5 的 Tris、2 mM CaCl₂、2 mM MgCl₂ 和 2 mM MnCl₂ (TBSM)来包被 100 μl 的 5 μg/ml 人整联蛋白 α4β7 过夜。用含 1% BSA 的 TBSM 封闭孔 1 小时。对于第一轮选择, 应用经靶包被过的 8 个孔; 对于接下来的选择轮次, 应用单个靶包被的孔。从培养物上清液中收获噬菌体, 并悬浮于含 1% BSA 和 0.05% TWEEN™ 20 的 TBSM (TBSMBT)中。与孔结合 2 小时后, 用含 0.05% TWEEN 20 的 TBS (TBST)全面清洗以去除未结合的噬菌体。通过用 100 mM HCl 温浴孔 30 分钟, 来洗脱结合的噬菌体。用 Top10 细胞和 M13/KO7 辅助噬菌体来扩增噬菌体, 并于 37°C 在含 50 μg/ml 羧苄青霉素的 2YT 中生长。靶包被的孔中洗脱下的噬菌体的滴度与不用靶包被的孔中收获的噬菌体的滴度作比较, 由此评估丰度。进行 4 轮选择后, 随机选择克隆进行序列分析。

Fab 的产生和亲和力的确定 – 为了表达 Fab 蛋白来测定亲和力, 将终止密码子导入噬菌体展示载体的重链和 g3 之间。将克隆转化入大肠杆菌 34B8 细胞中并于 30°C 在 AP5 培养基中生长 (Presta, L.等, Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997))。离心收获细胞, 悬浮于 pH 8 的 10 mM Tris、1 mM EDTA 的溶液中, 并用强化微流态剂裂解。用 G 蛋白亲和层析来纯化 Fab。

通过表面等离子共振利用BIAcore™-3000 (Biacore, Piscataway, NJ), 来进行亲和力的确定。用10mM pH 4.5的乙酸盐将人源化Fib504 Fab 变体 (250至1500响应单位 (RU)) 固定于CM5传感芯片上, 并注入溶有2倍稀释的人整联蛋白α4β7 (1.5至 770 nM) 并含2% n-辛基葡糖苷的TBSM中。以5分钟结合和5至60分钟解离的时间来分析每个样品。每次注射后, 用1分钟注入 8 M尿素, 进行三次, 由此再生芯片。通过扣除空白流出细胞的RU来修正结合响应值。用k_{on}和k_{off}同时拟合的1:1 Languir模型来进行动力学分析。

结果和讨论

大鼠 Fib504 的人源化: 用于人源化的人受体框架是基于 HERCEPTIN® 所用的框架, 其由共有人 κ I (huKI) VL 结构域和人亚型 III (humIII) 共有 VH 结构域的变体组成。该变体 VH 结构域与人共有序列相比有 3 个变化: R71A、N73T 和 L78A。大鼠 Fib504 的 VL 和 VH 结构域分别能与 人 κ I 和

亚型 III 结构域排列配对; 鉴定每个高变区 (HVR) 并移植入人受体框架中, 用以产生 HVR 移植物 (504 移植物), 其可作为 Fab 展示在噬菌体上(图 1A 和 1B)。

基于可用的抗体和抗原复合物晶体结构的分析, MacCallum 等 (MacCallum 等 *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)) 提出了基于频繁接触抗原的可变结构域残基的 HVR 定义。因而, 重链的第 49G 和 94M 位包括在 Fib504 的 HVR 移植物中 (图 1B)。另外, 也产生了第二个 HVR 移植物 (Fib504K 移植物), 其包括轻链的第 49K 位, 因为该位置也在 HVR-L2 的接触定义范围内, 并能用作抗原接触(图 1A)。当 Fib504 或 Fib504K 移植物展示于噬菌体上并与固定的 $\alpha 4\beta 7$ 进行结合测试时, 没有观察到结合。

利用 Fib504 和 Fib504-K HVR 移植物, 其中每个 HVR 区域都同时被软随机化了, 由此来产生文库。每个 HVR 移植物文库针对固定的 $\alpha 4\beta 7$ 进行 4 轮选择。没有观察丰度, 而选出用于 DNA 序列分析的克隆显示出仅仅有靶向于 6 个 HVR 区的随机序列变化。

研究两个额外的 VH 框架序列 (“RL”和“RF”) 用作受体框架的情况, 其在第 71 和 78 位上包含改变。如在人亚型 III 共有序列中, 第 71 位变为精氨酸, 而如在人亚型 III 共有序列 (受体框架 “RL”) 中则第 78 位变为亮氨酸, 或如在人亚型 II 共有序列和大鼠 Fib504 VH 框架 (受体框架 “RF”) 中则变为苯丙氨酸(图 10A)。当 “RL” (Fib504-RL 和 Fib504K-RL) 或 “RF” (Fib504-RF 和 Fib504K-RF) 受体框架中的 Fib504 或 Fib504K 移植物展示于噬菌体上并与固定的 $\alpha 4\beta 7$ 进行结合测试时, 对于利用 “RF” 框架的 Fib504K 移植物, 仅仅观察到了特异性噬菌体结合(图 10B)。相对于其它缺少 Y49K (轻链) 和 L78F (重链) 的移植物, 噬菌体展示的 Fib504-RF 移植物的适中 (modest) 结合性显示出了这些位置对于选择有用的受体框架的重要性。

可产生文库, 其首先在 Fib504K-RL 和 Fib504K-RF 移植物的 6 个 HVR 的每一个上同时利用软随机化策略, 并在固定的 $\alpha 4\beta 7$ 上进行如上所述的 4 轮筛选。仅仅对基于 Fib504K-RF 移植物的文库观察丰度。选择来自第 4 轮的 Fib504K-RF 文库的克隆, 用来进行序列分析并揭示出靶向于 HVR-L1 的氨基酸变化。大多数克隆包含 Y32L 变化; 另外, 第 31 位通常变为 D、S、P 或 N (图 1C)。除了初始移植物 (Fib504K-RF), 表达 3 个克隆并纯化为 Fab 蛋白, 如上所述, 通过 Biacore 进一步分析。克隆 hu504-5、hu504-16

和 hu504-32 (含 T31S 和 Y32L(变体 hu504.5)、Y32L (变体 hu504.16)、或 T31D 和 Y32L (变体 hu504.32)替换的 SEQ ID NO:1 的变体;参见图 1C), 相对于 Fib504K-RF 移植物, 显示出极好的与 $\alpha 4\beta 7$ 的结合性, 其达到或超过了嵌合 Fib504 Fab 与 $\alpha 4\beta 7$ 结合的亲和力。Biacore 分析结果如下表 3 所示, 其显示出了在 HVR 和/或框架区中选择性的变化, 如本文所述, 产生了针对 $\alpha 4\beta 7$ 的拮抗剂抗体, 其相对于初始抗体具有改善的亲和力。表 3 中的结果显示, 人源化变体 504.32 相对于初始的大鼠抗体, 显示出了最大的亲和力增加, 其与 $\alpha 4\beta 7$ 的结合牢固 3 倍以上。

表 3

Fab (BIAcore™ 分析)	对 $\alpha 4\beta 7$ 的亲和力 (nM)
Fib504	11
变体 504.5	9
变体 504.16	23
变体 504.32	3

表 3 中的结果也显示了重新设计 HVR-L1 对恢复高抗原结合亲和力来说是重要的。尤其, Y32L 突变在各个克隆中最常见的。第 31 位上的其它改变和 HVR-H1 中的许多其它替换似乎可以被很好地耐受, 并可提供额外的改进。由这些结果, 清楚表明了有多个序列变化可改善移植到人框架上的 Fib504 的亲和力, 由此产生达到或大于初始大鼠抗体的亲和力。

因此, 从 6 个大鼠 Fib504 HVR 移植物进入人受体骨架中开始, 扩充 HVR-L2 以包括第 49 位(赖氨酸)、扩充 HVR-H2 以包括第 49 位(甘氨酸)、和扩充 HVR-94 以包括第 94 位(甲硫氨酸), 以及 VHR-L1 的第 32 位的氨基酸变化(其中, L 或 I 替换 Y)以及, 可选地, VHR-L1 的第 31 位的氨基酸变化(例如其中, T 替换为 D 或 S)。在 VH 结构域中的第 71 (A71R)和 78 (L78F) 位上制备出有用的框架氨基酸变化。例如, 这些氨基酸变化导致形成了对 $\alpha 4\beta 7$ 整联蛋白结合亲和力有 3 倍改善的全长人抗体(变体 hu504.32)。更进一步确定了本文所述的选择出人源化抗体具有至少与亲本大鼠 Fib504 抗体相似的生物活性(参见本文的实施例 3)。

实施例 2: 额外的人源化 Fib504 HVR 变体

人源化变体 Fib504.32 的 HVR 氨基酸序列经进一步修饰,产生出额外的变体,其能够拮抗 $\beta 7$ 整联蛋白亚基和/或含 $\beta 7$ 亚基的整联蛋白的活性。

产生广泛氨基酸扫描文库 - 利用 3 种寡聚核苷酸产生文库,针对能够产生变体 hu504.32 的 $\beta 7$ 结合变体的其它氨基酸残基,所述文库用来扫描选定的 HVR 位置: 504-L1,其如上所述,被设计以 hu504.32 HVR-L1 序列(即序列 ASESVDDLLH (SEQ ID NO: 47, 对应于第 A2-A11 位) 偏好来软随机化一部分 HVR-L1); 和 HVR-L3 504-N96 和 HVR-H3 504-M94,其在轻链 HVR-L3 第 96 位和重链 HVR-H 第 94 位的位置上导入 NNS,因而在这些位置上允许出现所有 20 种氨基酸。如上所述,用这 3 种寡聚核苷酸,利用轻链中含 3 种终止密码子(HVR-L1 的第 31 和 32 位和 HVR-L3 的第 96 位)和重链中的 1 种终止密码子 (HVR-H3 的第 94 位)的模板,来产生广泛氨基酸扫描文库(broad amino acid scan library)。

hu504-32 广泛氨基酸扫描: 为了更充分地探索 HVR-L1 中容许的优选序列并为了增强 504-32 的稳定性,我们设计了噬菌体文库,其 a)在人源化期间在观察到变化的区域中软随机化了 504-32 的 HVR-L1(即 ASESVDDLLH (SEQ ID NO: 47, 对应于第 A2-A11 位) (图 1C), 和 b) 在 HVR-L3 的 N96 位和 HVR-H3 的 M94 位上容许所有可能的氨基酸。如上所述,经过针对固定的全长人整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 的 4 轮选择后,挑选出了 96 个随机克隆用于序列分析。在广泛氨基酸扫描文库中的每个位置上发现氨基酸的频率提示了,存在于 hu504-32 中的 HVR-L1 序列和重链第 94 位上的甲硫氨酸是最适合高亲和力结合的(图 12)。通过起始自变体 504.32 (图 12) 的选择而得到的最优选的氨基酸以黄色显示。相反,尽管天冬酰胺出现在 hu504-32 轻链的第 96 位上,但是在广泛氨基酸扫描文库中该位置上观察到的高频率的亮氨酸提示了, N96L 突变可进一步改善人源化 Fib504 变体对 $\alpha 4\beta 7$ 的亲和力并也消除了在该位上的任何潜在的脱酰胺基问题。图 12 中的信息也提示了,许多替代氨基酸在大多数位置上可能是容许的而且实质上并不丧失亲和力。例如,为了消除在 HVR-H3 中 M94 的氧化,可能可以替换谷氨酰胺或精氨酸。

产生有限氨基酸扫描文库 - 用于有限氨基酸扫描的 6 个文库利用了 6 个不同的 Kunkel 模板,每个包含一个位于 6 个 HVR 之一内的终止密码子。利用编码单个 HVR 的单个寡聚核苷酸并利用列于图 11A (“密码子” 栏)中

的密码子来产生每个文库，来改变氨基酸残基用以接着测试与 $\beta 7$ 或 $\alpha 4\beta 7$ 的结合性。相同的过程被用于改变抗- $\beta 7$ 抗体的氨基酸残基并测试它们与 $\alpha E\beta 7$ 整联蛋白的结合性。

hu504-32 的有限氨基酸扫描： hu504-16 的有限氨基酸扫描被设计用于制备更像人的轻和重链共有序列的 hu504-16，而且在该过程中鉴定大鼠 Fib504 结合所需的最少序列元件。产生 6 个文库，其针对每一个 HVR 中的、hu504-16 和人共有 κI 轻或亚型 III 重链之间有差别的位置(图 1A 和 1B)；文库中的这些位置上容许大鼠或人的氨基酸 (图 11A)。为了在寡聚核苷酸合成和突变时适应编码两个氨基酸，在一些情况下也可导入氨基酸 (参见图 11A 的编码的氨基酸)。如上所述，针对固相的全长人整联蛋白 $\alpha 4\beta 7$ 选择有限氨基酸扫描文库，在第 3 轮后从每个文库中挑约 32 个随机克隆进行测序。每个位置上发现的每种氨基酸的频率如图 11B 和 11C 所示。

如同广泛氨基酸扫描，有限氨基酸扫描也提供了关于在人源化 Fib504 的许多位置上容许什么变化的信息。可是与广泛氨基酸扫描不同的是，有限氨基酸扫描中随机化的每个位置上容许的多样性被限制为一对氨基酸。因而在给定位置上任何缺少观察的替换不能表明特定残基不能改变，或在给定位置上任何特定氨基酸的高频率也不能表明它对于高亲和力是最佳解决方案。

在一些位置 (轻链的 27、29、30、53、54 位和重链的 50、54、58、60、61、和 65 位) 上，相当频繁地选择到的人共有氨基酸提示了针对人共有序列的回复突变，其不会显著改变与人 $\alpha 4\beta 7$ 的结合性。实际上，在轻链的第 54 位上(在 HVR-I.2 中)，较之大鼠 Fib504 的氨基酸能更频繁地选择到的人共有氨基酸，表明该 504-32 上所产生的改变提供了有用的 $\beta 7$ 结合抗体。

进一步，作为文库设计的结果，在一些位置上更频繁地选择到的不是源自人共有或大鼠 Fib504 的氨基酸，其提供了潜在的替换以改善人源化 Fib504 变体的亲和力。这些包括而不限于，轻链中的 D30A 和 I55V 以及重链中的 Y50F。这 2 个文库的结果显示，许多 HVR 容许其它氨基酸替换并仍旧保持相应的生物活性。

观察到的氨基酸变化的概要如图 13 和 15 所示。图 15 概述了本发明抗体变体 CDR 中每个位置上的有用的各种氨基酸，其编号是根据 Kabat 编号或相关编号系统而定的。图 13 和 15 所述的变体所涵盖的每个额外的抗体

都是本发明的具体实施方案。

实施例 3: 细胞粘着测试

一些本发明人源化 Fib504 变体结合表达于细胞表面上的配体的能力可由细胞粘着试验来测定。通过人源化变体阻断整联蛋白与其天然受体的结合能力来测试与 $\alpha 4\beta 7$ 和其它 $\beta 7$ 整联蛋白 ($\alpha E\beta 7$) 的结合。通过相似方式测试人源化 Fib504 变体同在细胞表面上表达单独的 $\beta 7$ 亚基的结合。过程和结果如下所述。

IgG 生产: 利用分别对应于轻和重链的各个载体在 293 细胞 (Graham 等 (1977) 同上) 中瞬时表达人源化 Fib 504 IgG 变体。对于每个轻和重链, 通过将轻或重链可变结构域亚克隆进合适的表达载体中, 由此构建载体。人源化 Fib504 变体的 1.1 L CHO 细胞培养物的上清液过 0.45 μm 滤膜过滤, 并上样于新的用缓冲液 A (10 mM pH 7.5 的 tris, 150 mM NaCl) 平衡的 1 mL HiTrap 蛋白 A HP 柱 (Amersham/Pharmacia)。于 4 摄氏度以 0.8 mL/分钟上样过夜。然后洗涤每个柱并用 30 mL 缓冲液 A 平衡。于室温, 通过 FPLC (Amersham/Pharmacia) 以 0 至 100% 缓冲液 B (100 mM 甘氨酸, pH 3.0) 的线性梯度以 1 mL/分钟层析 14 分钟, 来实现抗体的洗脱。得到的 1 mL 级份通过立即加入 75 μL pH 8 的 1 M tris 来中和。洗脱的蛋白质通过检测 280 nm 处的光吸收来检测, 合并峰级份并在可多次使用的 PD10 G-25 sephadex 凝胶柱 (Amersham/Pharmacia) 上加入 PBS 脱盐。以 OD280 来检测蛋白质并合并峰级份。PBS 中的抗体用 0.22 μm 滤膜过滤并储存于 4 摄氏度。用氨基酸分析来定量这些纯化的抗体的浓度, 通过两次独立测定的平均值来得出浓度值。

BCECF 标记:

本实施例 3 中出现的每个测试中, 细胞根据以下过程来标记。在 RPMI1640 培养基 (对于 RPMI8866 细胞和转染了 $\beta 7$ 亚基的 38C13 细胞 (38C13 $\beta 7$ 细胞), 其含 10% FBS) 和 F-12: DMEM 混合物 (50: 50) (对于 $\alpha E\beta 7$ 转染的 293 细胞 ($\alpha E\beta 7$ 293 细胞), 其含 10% FBS) 中, 所有用于粘着测试的细胞用 10 μM 的 2', 7'-二-(2-羧乙基)-5-(并-6)-羧基荧光素、乙酸基甲基酯 (BCECF) 标记。标记细胞 30 分钟并用试验用培养基洗涤两次。对于 RPMI8866 和 38C13 $\beta 7$ 细胞, 将细胞密度调节至每 ml 3×10^6 个细胞, 而对于 $\alpha E\beta 7$ 293 细胞, 至每 ml 2.2×10^6 个细胞。

人源化 Fib504 变体阻断 $\alpha 4\beta 7$ 同 MAdCAM 的结合

RPMI8866/MAdCAM-1-Ig 的细胞粘着: RPMI8866 细胞在其表面上表达 $\alpha 4\beta 7$ (Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, NY)。人源化 Fib504 变体 (hu504 变体) 同 RPMI8866 细胞和与包被在固相基质上的 IgG 融合的 MAdCAM 的混合物接触。通过用 2 $\mu\text{g/ml}$ PBS、100 $\mu\text{l/孔}$ MAdCAM-1-Ig (Genentech, Inc., 其中 Ig 指 MAdCAM-1 与 Fc 区的融合蛋白) 包被 Nunc Maxisorp™ 96 孔板于 4 °C 过夜, 来测定会对 RPMI8866 细胞与 MAdCAM-1 结合产生 50%抑制的人源化 Fib504 变体浓度(IC₅₀)。于室温用 200 $\mu\text{l/孔}$ 的 5 mg/ml BSA 封闭平板一小时, 然后向每个孔加入 50 μl 含人源化 Fib504 变体的试验培养基 (RPMI 1640 培养基, Hyclone®, Logan Utah, 美国, 其添加有 5 mg/mL BSA), 并向每个孔加入含 150, 000 个 BCECF-标记的细胞 (BCECF, Molecular Probes, Eugene, OR) 的 50 μl 试验培养基, 于 37 °C 孵育 15 分钟。用 150 μl 试验培养基洗孔两次以去除未结合的细胞。用 100 μl 含 0.1% SDS 的 pH7.5 的 50 mM Tris/HCl 溶解结合的细胞。用 SPECTRAMax GEMINI™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)以 485 nm 激发波长和 530 nm 发射波长来测量裂解细胞中释放的荧光量。分析荧光值, 作为每个试验中加入的人源化 Fib504 变体的浓度的函数, 利用四参数非线性最小面积拟合法(four-parameter least squares fit), 来获得试验中每个人源化 Fib504 变体的 IC₅₀ 值。从四参数匹配法中推算出 IC₅₀ 和 IC₉₀ 值。图 14 是示例性的结果图表。每个变体测试的 IC₉₀ 和 IC₅₀ 值如下表 4 所示。

表 4

抗体与人 MAdCAM-1 的结合

测试的抗体:	IC ₅₀ (nM)	IC ₉₀ (nM)
Fib504 和 hu504 变体	Exp 1/Exp 2*	Exp 1/Exp 2*
大鼠 Fib504	0.098/0.197	0.483/0.703
变体 hu504.5	0.067/0.248	0.361/0.880
变体 hu504.16	0.0768/0.206	0.244/0.551
变体 hu504.32	0.036/0.119	0.150/0.396
6B11 (未阻断的对照)	>100	>100

*Exp 1/Exp 2 指重复试验的结果。

人源化 Fib504 变体阻断 $\alpha 4\beta 7$ 同 VCAM 的结合

RPMI8866/7dVCAM-1 的细胞粘着: RPMI8866/7dVCAM-1 测试与测试 RPMI8866/MAdCAM-1-Ig 的方法相似, 不同点在于, 用 2 ug/ml 的 7dVCAM-1 (ADP5, R&D Systems, Minneapolis, MN) 来包被平板。如上所述来分析 MAdCAM 结合实验的结果。每个测试变体的 IC₅₀ 值如下表 5 所示。

表 5

抗体与人 VCAM 的结合

测试的抗体:	IC ₅₀ (nM)	IC ₉₀ (nM)
Fib504 和 hu504 变体	Exp 1/Exp 2*	Exp 1/Exp 2*
大鼠 Fib504	0.107/0.193	0.396/0.580
变体 hu504.5	0.088/0.270	0.396/0.726
变体 hu504.16	0.098/0.223	0.261/0.774
变体 hu504.32	0.059/0.110	0.183/0.337
6B11 (未阻断的对照)	>100	>100

*Exp 1/Exp 2 指重复试验的结果。

人源化 Fib504 变体阻断 α E β 7 同人 E-钙粘着蛋白的结合

α E β 7 293/huE-钙粘着蛋白的细胞粘着: 用 α E 和 β 7 (Genentech, Inc.) 转染 293 细胞 (Graham 等 (1977) 同上)。实验方法与 RPMI8866/MAdCAM-1-Ig 的测试相似, 不同点在于, 用 2 ug/ml 的 huE-钙粘着蛋白 (648-EC, R&D Systems, Minneapolis, MN) 来包被平板。用上述 5 mg/ml BSA 封闭平板一小时, 向每个孔加入 50 μ l 含 FIB504 变体的试验培养基 (F-12: DMEM (50: 50), 其添加有 5 mg/ml BSA), 并向每个孔加入含 110, 000 个 BCECF-标记的细胞 (BCECF, Molecular Probes, Eugene, OR) 的 50 μ l 试验培养基, 于 37 °C 孵育 15 分钟。如上所述, 用 150 μ l 试验培养基洗孔 2 次, 并测量和分析裂解细胞释放的荧光量。三次实验的测试结果如表 6 所示。

表 6

抗体与人 E-钙粘着蛋白的结合

测试的抗体:	IC ₅₀ (nM)	IC ₉₀ (nM)
Fib504 和 hu504 变体		
大鼠 Fib504	2.047/7.89/4.19	8.80/24.5/9.95
变体 hu504.5	2.132/10.18/4.77	7.99/28.7/10.19

变体 hu504.16	1.957/10.05/4.58	7.03/33.7/13.51
变体 hu504.32	1.814/6.99/3.47	8.8/24.5/11.73
HP2/1 (抗- $\alpha 4$, 对照)	>100/>100/>100	>100/>100/>100

人源化 Fib504 变体阻断 $\beta 7$ 同 MAdCAM 的结合

38C13 $\beta 7$ /muMAdCAM-1-Ig 的细胞粘着测试:

38C13 $\beta 7$ /muMAdCAM-1-Ig 测试与 RPMI8866/MAdCAM-1-Ig 的测试方法相似, 不同点在于, 用 2 $\mu\text{g/ml}$ 的 muMAdCAM-1-Ig (Genentech, Inc.) 包被平板。用编码整联蛋白 $\beta 7$ 的 DNA 转染 38C13 $\alpha 4+$ 小鼠淋巴瘤细胞 (Crowe, D.T.等, J. Biol. Chem. 269: 14411-14418 (1994)), 由此使得 $\alpha 4\beta 7$ 在细胞表面表达。如上进行测定抗体变体阻断细胞膜结合的 $\alpha 4\beta 7$ 和 MAdCAM 之间的相互作用的能力。测试结果如表 7 所示。测试结果如表 7 所示。(显示的是 2 次实验的 IC₅₀ 和 IC₉₀ 值)。

表 7

变体抗体在 38C13- $\beta 7$ 表达细胞同小鼠 MAdCAM 结合中的活性

测试的抗体:	IC ₅₀ (nM)	IC ₉₀ (nM)
Fib504 和 hu504 变体		
大鼠 Fib504	0.682/0.306	2.869/1.51
变体 hu504.5	0.8587/0.466	2.322/2.61
变体 hu504.16	0.998/0.610	3.717/4.08
变体 hu504.32	0.718/0.458	4.08/1.51

人源化 Fib504 变体阻断 $\beta 7$ 同小鼠 VCAM 的结合

38C13 $\beta 7$ /muVCAM-1-Ig 的细胞粘着测试: 根据以上小鼠 MAdCAM-1-Ig/RPMI8866 细胞结合试验来进行 38C13 $\beta 7$ /muVCAM-1-Ig 测试, 不同点在于, 用 2 $\mu\text{g/ml}$ 的 muVCAM-1-Ig (Genentech, Inc.) 包被平板。试验结果如表 8 所示。(显示的是 2 次实验的 IC₅₀ 和 IC₉₀ 值)。

表 8

hu504 变体抗体在 38C13- $\beta 7$ 表达细胞同小鼠 VCAM-1-Ig 结合中的活性

测试的抗体:	IC ₅₀ (nM)	IC ₉₀ (nM)
Fib504 和 hu504 变体		
大鼠 Fib504	0.845/0.447	2.903/2.30

变体 hu504.5	0.763/0.407	3.074/2.30
变体 hu504.16	0.835/0.584	2.857/1.84
变体 hu504.32	0.562/0.330	2.004/1.84

人源化 Fib504 变体的结合研究的结果证明了, 本发明的人源化抗体结合其 $\beta 7$ 整联蛋白亚基以及 $\alpha 4\beta 7$ 和 $\alpha E\beta 7$ 整联蛋白的靶位, 其亲和力约等于初始大鼠抗体的亲和力, 而在一些具体实施方式中, 其亲和力更大。因而, 根据本发明的人源化抗- $\beta 7$ 抗体可用于抗- $\beta 7$ 整联蛋白的疗法中, 尤其是人的疗法中。

本发明 hu504.32 变体的相对活性

根据本文所述的细胞粘着测试方法, 在人和小鼠细胞粘着试验中, 测试 hu504.32 抗体的不同的氨基酸变体, 测试它们抑制含 $\beta 7$ 的受体与其配体结合的能力。如本文所述来进行 RPMI8866/MAdCAM-1-Fc 测试。通过将人 E-钙粘着蛋白-Fc 用作配体 (人 E-钙粘着蛋白-Fc, 648-EC, R&D Systems, Minneapolis, MN), 来修正 $\alpha E\beta 7$ -293/hu E-钙粘着蛋白测试。还检测了 hu504.32 变体抑制人纤连蛋白 (huFN40) 同 RPMI8866 细胞上的人 $\alpha 4\beta 7$ 受体相互作用的相对能力。用于这些研究的 RPMI8866/hu 纤连蛋白 (huFN40) 试验与本文中公开的 RPMI8866/MAdCAM-1-Ig 测试方法相似, 不同点在于, 用 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的人纤连蛋白 40 kDa 的 α -胰蛋白酶酶解片段 (F1903, Chemicon International, Temecula, CA) 来包被平板。

检测了 hu504.32 变体抑制含 $\beta 7$ 的小鼠受体同小鼠 MAdCAM-1 或小鼠 VCAM-1 的相互作用的能力。通过 hu504.32 变体抑制小鼠 MAdCAM-1-Fc 和小鼠 VCAM-1-Fc 同表达小鼠 $\beta 7$ 的小鼠淋巴瘤 $\alpha 4$ +细胞(38C13 $\beta 7$ 细胞)的相互作用。小鼠 MAdCAM-1-Fc 和 VCAM-1-Fc 细胞粘着测试的实施与本文上述的用于人 MAdCAM 和 VCAM 的那些试验相似。当配体与 Fc 区融合时, 于室温用每 1 百万个细胞所含的 0.5 μg 抗-CD16/32 抗体(抗-Fc γ III/II 受体抗体, 目录编号 553142, BD Biosciences, San Jose, CA)封闭细胞上的 Fc 受体 5 分钟。向每个孔加入含 150, 000 个标记了的细胞的 50 μl 试验培养基并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 13 分钟。如本文以上所述, 洗涤孔并测量从裂解的细胞中释放的荧光量。人细胞粘着测试中的对照抗体是针对人血清白蛋白的小鼠单克隆抗体—6B11 (目录编号 ab10244, Novus Biologicals, Littleton,

CO, 美国)。小鼠细胞粘着测试中的对照抗体是大鼠抗-小鼠整联蛋白 $\beta 7$ 抗体—M293 (BD Biosciences, San Jose, CA), 其不与配体或不与 Fib504 竞争结合整联蛋白 $\beta 7$ 。

表 9 和 10 分别提供了人和小鼠细胞粘着测试中的三次测试结果。

表 9

hu504.32 变体抗体在人细胞粘着试验中的活性

抗体变体	IC50 平均值 \pm SD			
	RPMI8866/ huMAdCAM-1- Fc	RPMI8866/ hu7dVCAM-1	$\alpha E\beta 7$ -293/ huE-钙粘着蛋 白-Fc	RPMI8866/ huFN40
hu504.32	0.088 \pm 0.035	0.101 \pm 0.021	3.970 \pm 1.664	0.100 \pm 0.046
hu504.32M94Q	0.090 \pm 0.045	0.111 \pm 0.035	4.130 \pm 1.212	0.124 \pm 0.056
hu504.32M94R	0.075 \pm 0.034	0.089 \pm 0.009	3.963 \pm 1.776	0.119 \pm 0.056
对照 (6B11)	>100	>100	>100	>100

表 10

hu504.32 变体抗体在小鼠细胞粘着试验中的活性

抗体变体	IC50 平均值 \pm SD	
	38C13 $\beta 7$ / muMAdCAM-1-Fc	38C13 $\beta 7$ / mu7dVCAM-1-Fc
hu504.32	0.270 \pm 0.041	0.228 \pm 0.065
hu504.32M94Q	0.370 \pm 0.102	0.264 \pm 0.083
hu504.32M94R	0.391 \pm 0.112	0.228 \pm 0.081
对照 (M293)	>100	>100

hu504.32 抗体在重链 CDR3 的第 94 位上具有甲硫氨酸。变体 M94Q (或 hu504.32Q) 和 M94R (或 hu504.32R) 分别在 hu504.32 抗体变体的第 94 位上具有谷氨酰胺或精氨酸。在每个试验中, hu504.32M、Q、和 R 抗体充分降低了整联蛋白 $\beta 7$ 受体-配体相互作用, 因而, 它们是 $\beta 7$ 介导的细胞粘着的有效抑制剂。

抗体 hu504.32R 体内活性

在体内小鼠炎症性肠病模型中体内测试 hu504.32R 抗体变体, 测试其

减少整联蛋白 $\beta 7$ 受体-配体相互作用并减轻淋巴细胞向炎症结肠的募集的能力。BALB/c 鼠和 CB17 SCID 鼠得自 Charles River Laboratories International, Inc. (Wilmington, MA, 美国)。通过从供体 BALB/c 鼠中分离 $CD4^+CD45Rb$ 高 T 细胞并静脉输注含 3×10^5 个细胞的 $100 \mu l$ PBS, 来制备 $CD4^+CD45Rb$ 高 T 细胞重构的 SCID 结肠炎小鼠。对照 SCID 小鼠不接受 $CD4^+CD45Rb$ 高 T 细胞。重构的 $CD4^+$ 鼠达到入选治疗组的标准, 所述标准为相对于基线体重减轻 10%, 或在第 4 周相对于最高体重减轻 15%, 就被认为已经引发了炎症性肠病并被挑选用来治疗。

在用测试抗体治疗的那天, 收获供体 BALB/c 鼠肠系膜的淋巴结 (MLN) 细胞并用 Cr^{51} 放射性标记。治疗包括, 先静脉给药抗-GP120 抗体、hu504.32 抗- $\beta 7$ 抗体、hu504.32R 抗- $\beta 7$ 抗体、或不给药抗体 (对照), 给药剂量是 $200 \mu g/100 \mu l$ PBS。抗体给药 30 分钟后, 注射 Cr^{51} -标记的 MLN 细胞, 剂量是 4×10^6 细胞/ $100 \mu l$ 。注射标记细胞一小时后, 无痛处死鼠并收集脾、结肠、和派伊尔斑, 称重, 并测定每个器官的总 Cr^{51} 放射性。图 16 是这些测试结果的柱状图, 显示了抗体阻断放射性标记的 T 细胞归巢到患炎症性肠病的鼠结肠的相对能力。相对于阴性对照——抗-GP120 抗体, 用 hu504.32 和 hu504.32R 抗- $\beta 7$ 抗体抑制了 T 细胞归巢到发炎的结肠。对所有抗体来说, 脾脏中的分布都是类似的。因而, hu504.32 和 hu504.32R 抗- $\beta 7$ 抗体能在体内有效抑制 T 细胞归巢到患炎症的结肠。

抗体糖化不影响 hu504.32R 变体阻断 MAdCAM-1 同 $\alpha 4\beta 7$ 受体结合的能力。

糖化 (蛋白质的非酶催化的糖基化) 能影响抗体-配体的相互作用 (如参见 Kennedy, D.M. 等, Clin Exp Immunol. 98(2): 245-51 (1994)。观察到 hu504.32R 第 49 位上的赖氨酸糖化。hu504.32R 变体轻链第 49 位 (HVR-L2 对应的第 B1 位) 上的赖氨酸糖化, 但其对抗体变体阻断 MAdCAM-1 同 RPMI8866 细胞表达的 $\alpha 4\beta 7$ 受体的结合的能力没有显著影响。利用标准电喷雾离子化-质谱 (ESI-MS) 并通过硼酸亲和力层析来确定糖化和糖化水平。用于测试糖化的硼酸亲和力 HPLC 方法可在以下文献中找到, 例如, Quan C.P. 等, Analytical Chemistry 71(20): 4445-4454 (1999) 和 Li Y.C. 等, J. Chromatography A, 909: 137-145 (2001)。根据本文公开的 RPMI8866/MAdCAM-1-Fc 细胞粘着试验来进行细胞粘着测试。

在本发明可选的具体实施方式中，当第 49 位含除赖氨酸以外的氨基酸时，会减少或消除第 49 位上的糖化。本发明的多肽或抗体所涵盖的在第 49 位 (HVR-L2 对应的第 B1 位)上的氨基酸是任何氨基酸 A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、或 Y，其中每个字母指根据标准单字母氨基酸而命名的氨基酸。可选地，504.32R 变体 (或其它 504 变体)轻链第 49 位上的氨基酸选自由 R、N、V、A、F、Q、H、P、I、或 L 组成的组。例如，通过 hu504.32R Fab 在噬菌体(变体)上展示(制备噬菌体文库)并用 20 种天然产生的氨基酸中的每一种的密码子分别替换第 49 位的密码子，由此可选择出可用在第 49 位上的氨基酸。测试噬菌体表达的第 49 位改变的 hu504.32R 变体，测试其同整联蛋白 $\beta 7$ 和/或同含整联蛋白 $\beta 7$ 的受体 (如 $\alpha 4\beta 7$ 或 $\alpha E\beta 7$ 受体)的结合力。如本文所述，可进一步筛选那些与 $\beta 7$ 整联蛋白或 $\alpha 4\beta 7$ 或 $\alpha E\beta 7$ 受体结合的变体，筛选其抑制整联蛋白 $\beta 7$ 受体-配体结合和体内功效的能力。可选地，通过标准突变技术可在第 49 位上替换天然或非天然产生的氨基酸并用本文所述的细胞粘着和体内试验测试。可选地，轻链第 49 位上的氨基酸是除赖氨酸 (K)之外的氨基酸，在轻链和/或重链中 HVR 或框架的任何其它位置或多个位置上的氨基酸被改变以选择抗- $\beta 7$ 结合多肽或抗体变体，其通过降低整联蛋白 $\beta 7$ 的生物活性来显示出可用于减轻炎症的结合亲和力、体外和体内生物活性、药物动力学、药物清除性和免疫原性。如本文所述和根据其它标准技术，来进行突变和选择这些多肽或抗体变体。这些抗- $\beta 7$ 结合多肽或抗体变体显示出整联蛋白 $\beta 7$ 结合亲和力为本文所公开的任何人源化 Fib504 变体所显示的结合亲和力的 10,000 倍以内、1000 倍以内、可选地 100 倍以内、可选地 10 倍以内、可选地 5 倍以内、可选地 2 倍以内。

前述的说明书被认为能充分使所属领域技术人员实施本发明。由于保藏的具体实施方案是指本发明某些方面的单个例子，而功能等价的任何构建体在本发明的范围内，因此本发明并不限于保藏的构建体的范围内。本文中的保藏材料并不等于承认本文所包括的说明书不能够足以实施本发明的任何方面，包括其最佳模式，也不能解释为将权利要求的范围限制到它代表的特定例子上。事实上，除了本文所显示和描述的那些，本发明的各种修正对于读过前述说明书的所属领域技术人员来说是显而易见的，而且它们也落入所附的权利要求的范围内。

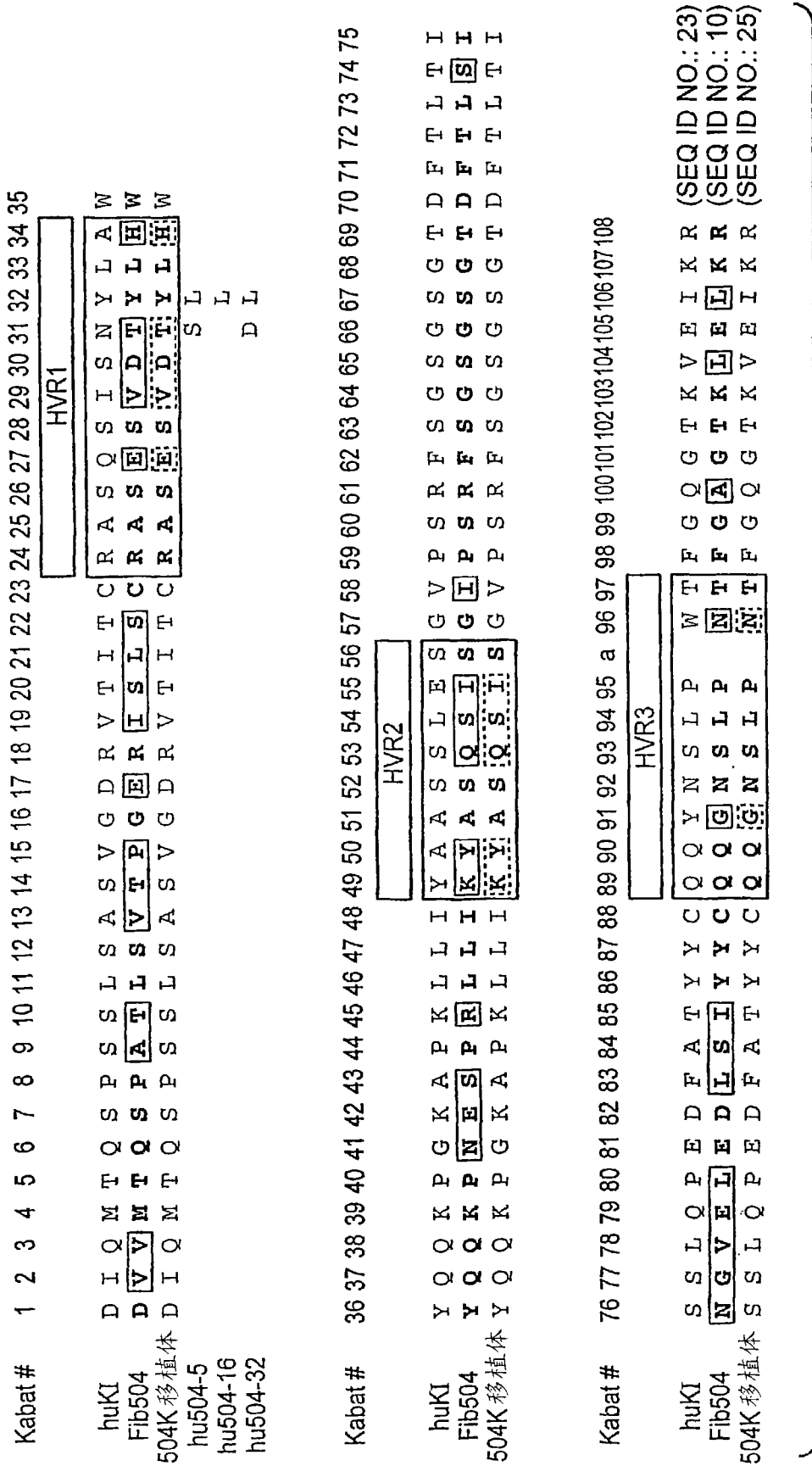


图 1A

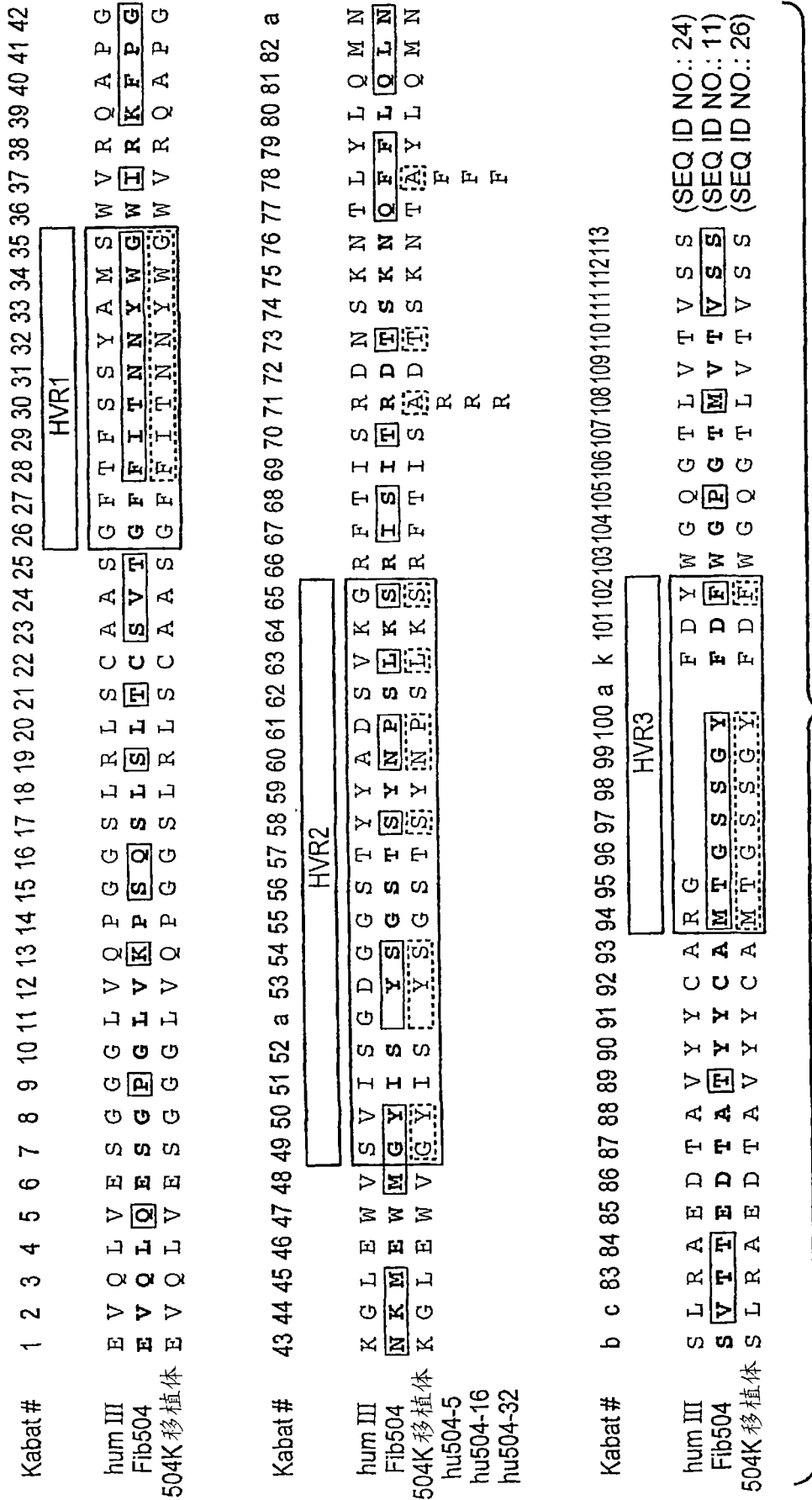


图 1B

人源化 Fib504 变体

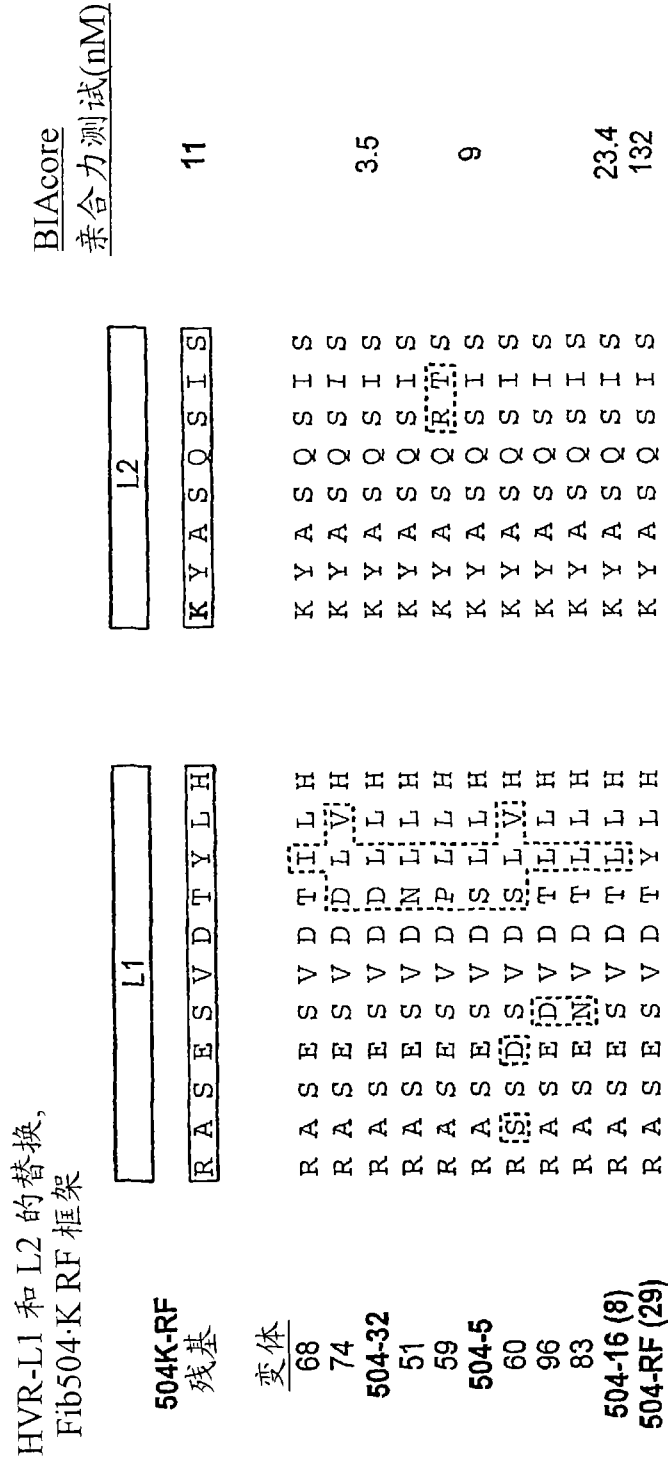


图 1C

人共有序列

轻链(K I)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQISISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLES
 GVPSRFRSGSGSGTDFTLTITSSSLQPEDFATYYCQOYNSLPWTFGQGTKVEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 27)

图 2A

人共有序列

重链(亚型 III)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVISGDGG
 STYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCMTGSSSGYFDFWGQGT
 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKT
 HTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 28)

图 2B

Fib504 移植体

轻链

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASESVDTYLHWYQQKPGKAPKLLIYYASQIS
 GVPSRFRSGSGSGTDFTLTITSSSLQPEDFATYYCQOQNSLPNTFGQGTKVEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 29)

图 3A

Fib504 移植体

重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGVRQAPGKGLEWVGYISYSGS
 TSYNPSLKSFRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCMTGSSSGYFDFWGQGT
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTH
 TCPCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 30)

图 3B

Fib504K 移植体

轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDTYLHWYQOKPGKAPKLLIKYASOSIS
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOQNSLPNTFGQGTKVEIKRTVAA
 PSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 31)

图 4A

Fib504K 移植体

重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGWRQAPGKGLEWVGYISYSGS
 TSYNPSLKSRTTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCMTGSSGYFDFWGQGT
 LTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 30)

图 4B

Fib504K-RF 移植体

轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDTYLHWYQOKPGKAPKLLIKYASOSIS
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOQNSLPNTFGQGTKVEIKRTVAA
 PSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 31)

图 5A

Fib504K-RF 移植体

重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGWRQAPGKGLEWVGYISYSGS
 TSYNPSLKSRTTISRDTSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCMTGSSGYFDFWGQGT
 LTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 32)

图 5B

人源化变体 504.32

轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASESVDDLLHWYQQKPGKAPKLLIKYASQIS
 GVPSRFSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOGNSLPNTFGQGTKVEIKRTVAA
 PSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 33)

图 6A

人源化变体 504.32

重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGWRQAPGKGLEWVGYISYSGS
 TSYNPSLKSRTISRDTSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCMTGSSGYFDWVGGTGL
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 32)

图 6B

大鼠抗小鼠的 Fib504 可变结构域

可变轻链

DVVMTQSPATLSVTPGERISLSCRASESVDTYLHWYQQKPNESPRLLIKYASQIS
 GIPSRFSGSGSGTDFTLSINGVELEDLSIYYCQOGNSLPNTFGAGTKLELKRADAA
 PTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCVFNMFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVLDVTDQDS
 KDSTYS (SEQ ID NO: 12)

图 9A

大鼠抗小鼠的 Fib504 可变结构域

可变重链

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGFFITNNYWGWRKFPGNKMEWMGYISYSGS
 TSYNPSLKSRI SITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCMTGSSGYFDWVGGTGM
 VTVSSAETTAPSVYPLAPGTALKSNMVTGLCLV (SEQ ID NO: 13)

图 9B

kv1 Z DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC -L1- WYQKPGKAPKLLIY -L2- GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQF
 kv1 X DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC -L1- WYQKPGKAPKLLI -L2- GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQF
 kv2 DIVMTQSPSLPVTGEPASISC -L1- WYLQKPGQSPQLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEA
 kv3 EIVLTQSPGTLSPGERATLSC -L1- WYQKPGQAPRLLIY -L2- GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
 kv4 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC -L1- WYQKPGQPPKLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA

图 7A

kv1 Z EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 14
 kv1 X EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 15
 kv2 EDVGVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 16
 kv3 EDFAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 17
 kv4 EDVAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 18

图 7B

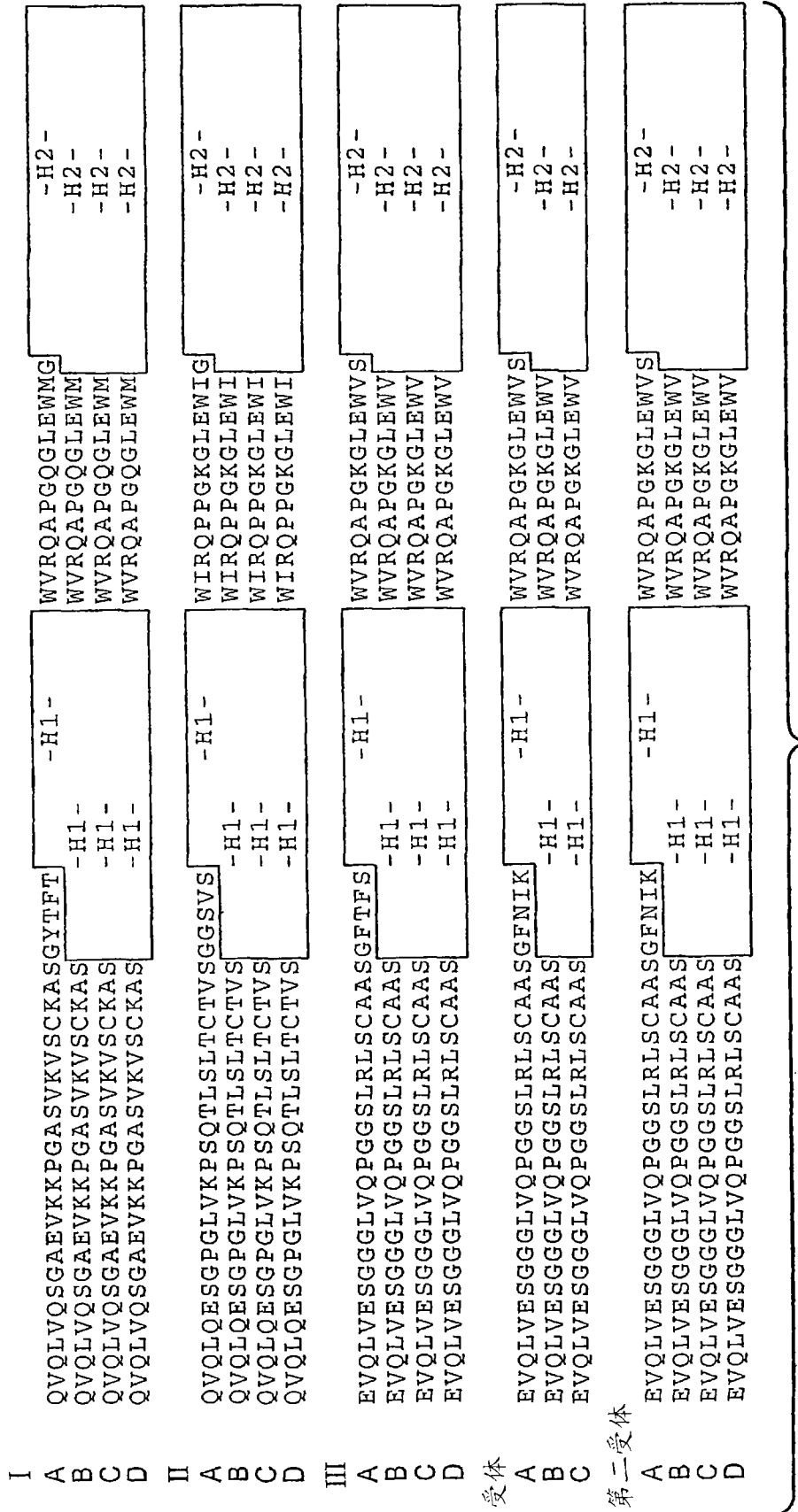


图 8A

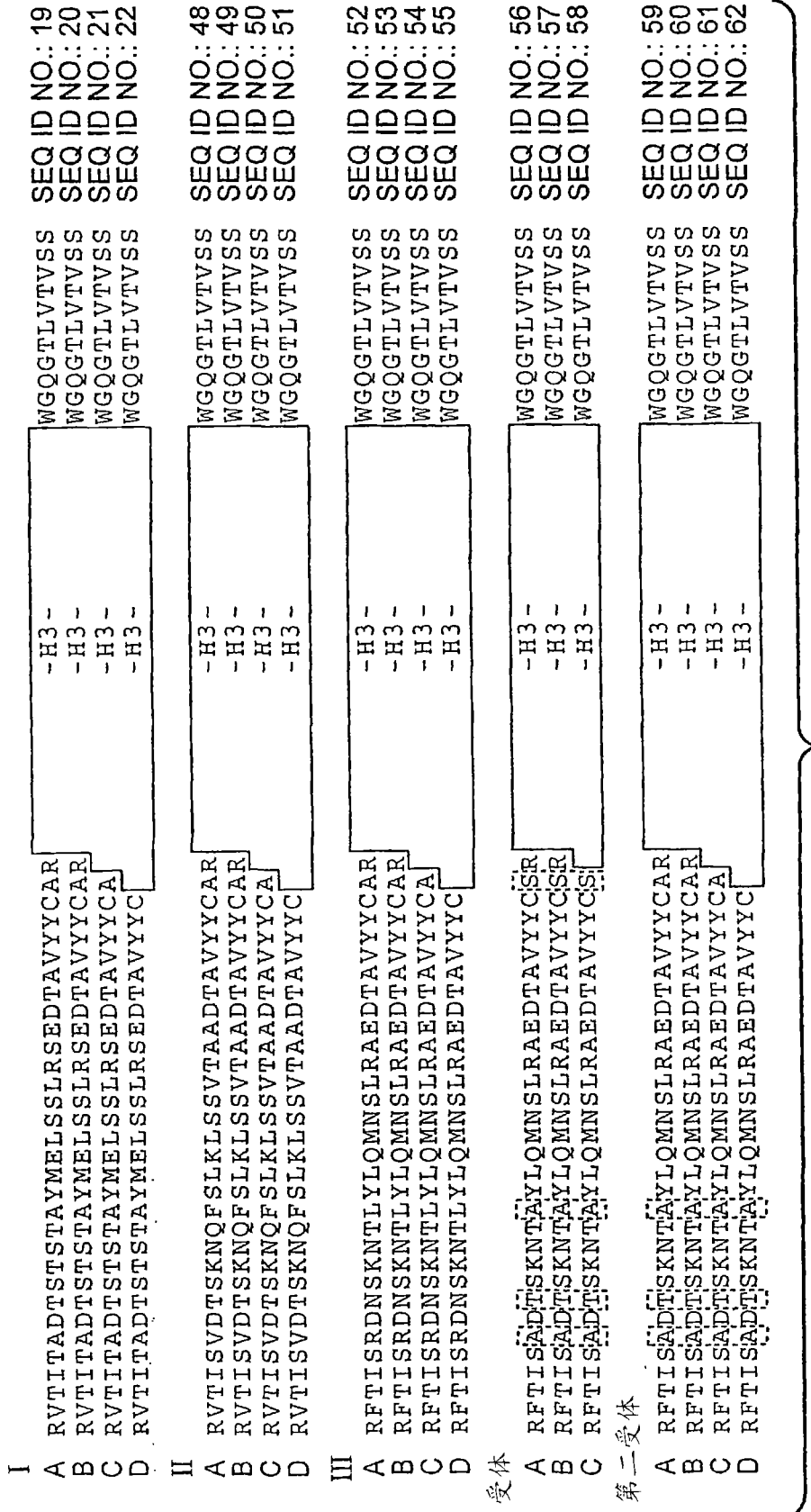


图 8B

VH 框架序列的比较

框架区 H3

	71	72	73	74	75	76	77	78
hu 亚型 I	A	D	T	S	T	S	T	A
hu 亚型 II	V	D	T	S	K	N	Q	F
hu 亚型 III	R	D	N	S	K	N	T	F
赫赛汀	A	D	T	S	K	N	T	A
Fib504	R	D	T	S	K	N	Q	F
Fib504-RL	R	D	T	S	K	N	T	F
Fib404-RF	R	D	T	S	K	N	T	F

图 10A

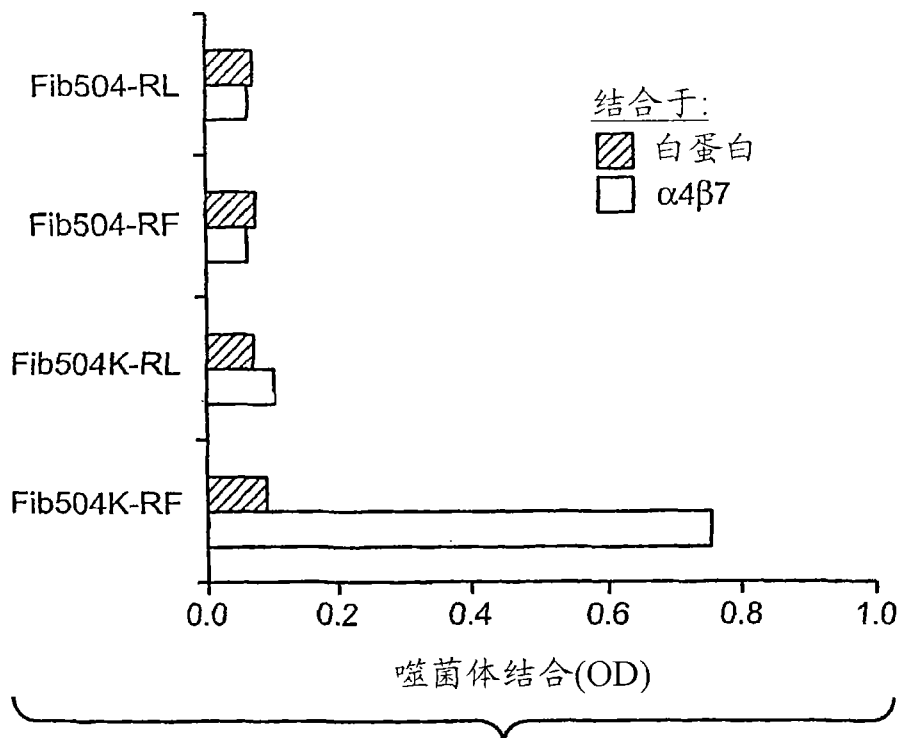


图 10B

504.16		人		密码子	氨基酸	氨基酸				
		共有			编码	保守				
HVR-L1		R	R							
	<u>25</u>	A	A							
		S	S							
	<u>27</u>	E	Q	SAA	EQ	E	Q			
		S	S							
	<u>29</u>	V	I	RTT	VI	V	I			
		D	S	KMT	DSAY	D	S	A		
	<u>31</u>	T	N	RAC	DN	D	N			
	L	Y	YWC	LYFH	L					
<u>33</u>	L	L								
	H	A	SMC	HADP	H					
HVR-L2	<u>49</u>	K	Y	WAW	KYNZ	K	N			
		Y	A	KMC	YADS	Y				
	<u>51</u>	A	A							
		S	S							
	<u>53</u>	Q	S	YMG	QSPZ	Q	S			
		S	L	TYG	SL	S	L			
	<u>55</u>	I	E	RWA	IEKV	I	E	K	V	
	S	S								
HVR-L3	<u>89</u>	Q	Q							
		Q	Q							
	<u>91</u>	G	Y	KRT	GYDC	G				
		N	N							
	<u>93</u>	S	S							
		L	L							
	<u>95</u>	P	P							
	N	W	WRS	NWYRSZ	N	W	Y	R	S	
<u>97</u>	T	T								

注: Z 是终止密码子. 最常观测到的氨基酸加框.

图 11A-1

504.16		人		密码子	氨基酸	氨基酸				
		共有			编码	保守				
HVR-H1	<u>26</u>	G	G							
		F	F							
	<u>28</u>	F	T	WYC	FITS	F				
		I	F	WTC	IF	I				
	<u>30</u>	T	S	ASC	TS	T				
		N	S	ARC	NS	N				
	<u>32</u>	N	Y	WAC	NY	N				
		Y	A	KMT	YADS	Y				
<u>34</u>	W	M	WKG	WMRL	W					
	G	S	RGC	GS	G					
HVR-H2	<u>49</u>	G	S	RGC	GS	G				
		Y	V	KWT	YVDF	Y	V	D	F	
	<u>51</u>	I	I							
		S	S							
	<u>53</u>	Y	G	KRT	YGCD	Y				
		S	G	RGC	SG	S	G			
	<u>55</u>	G	G							
		S	S							
	<u>57</u>	T	T							
		S	Y	TMT	SY	S	Y			
	<u>59</u>	Y	Y							
		N	A	RMC	NADT	N	A	D	T	
	<u>61</u>	P	D	SMT	PDAH	P	D	A	H	
	S	S								
<u>63</u>	L	V	STG	LV	L	V				
	K	K								
<u>65</u>	S	G	RGC	SG	S	G				
HVR-H3	<u>93</u>	A	A							
		M	R	AKG	MR	M				
	<u>95</u>	T	G	RSC	TGAS	T				
		G								
	<u>97</u>	S								
		S								
	<u>99</u>	G								
		Y								
	F	F								
<u>101</u>	D	D								
	F	Y	TWC	FY	F	Y				

图 11A-2

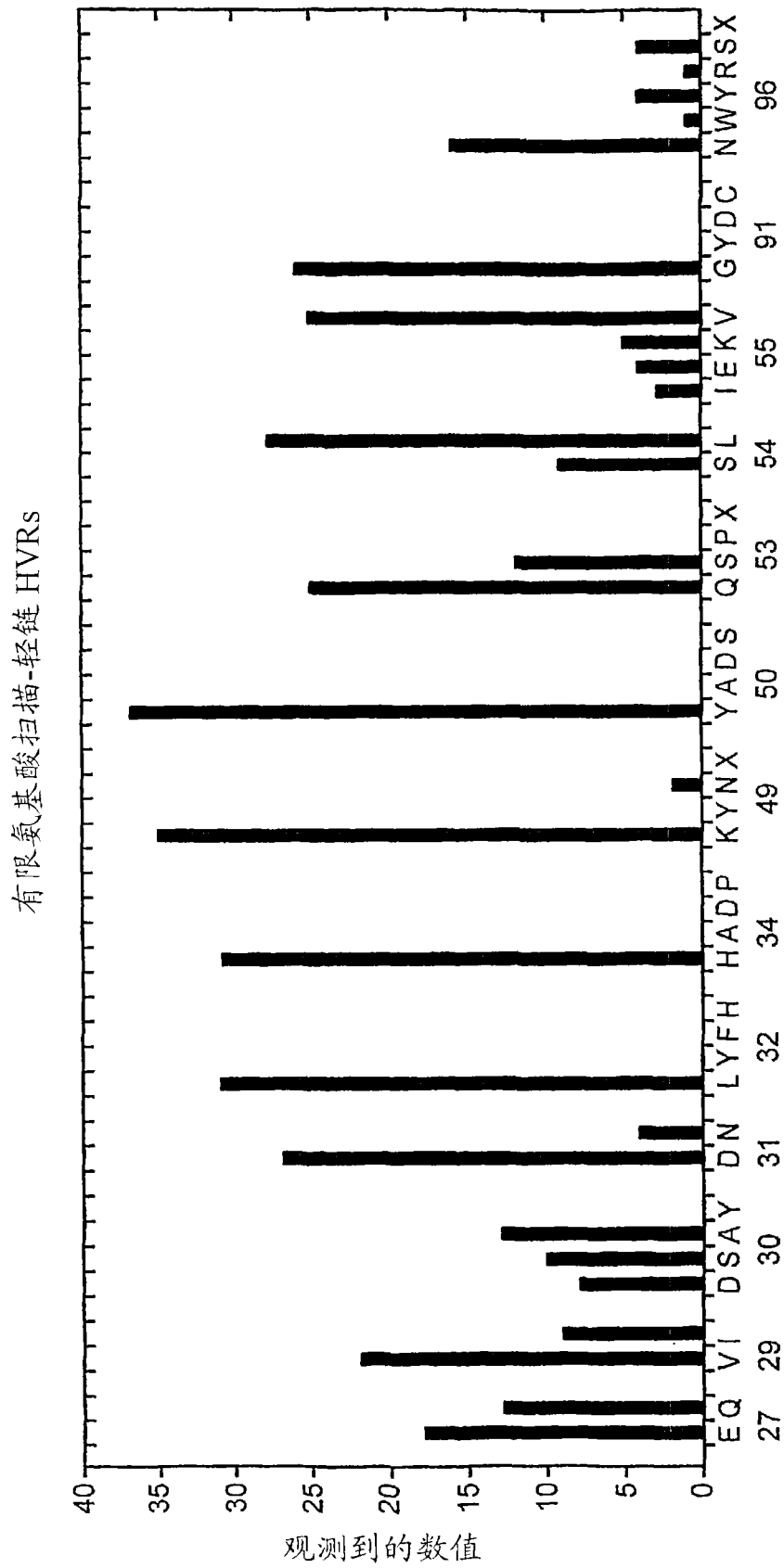


图 11B

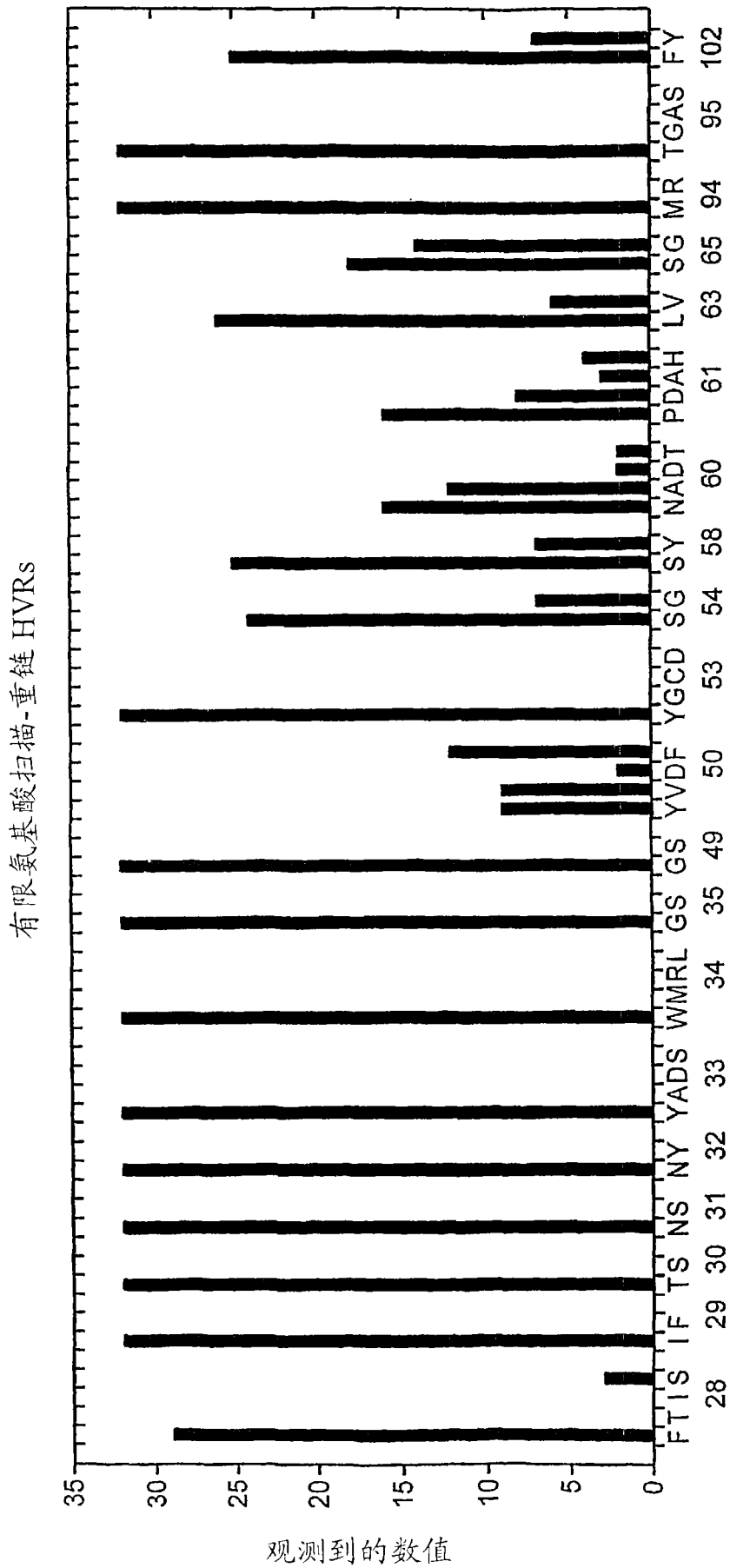


图 11C

氨基酸位置	氨基酸													
	观测到的次数													
HVR-L1	A25	<u>A</u> 64	<u>G</u> 2	<u>S</u> 11	<u>I</u> 7	<u>Y</u> 9								
	S26	<u>G</u> 4	<u>I</u> 2	<u>K</u> 3	<u>N</u> 8	<u>P</u> 1	<u>Q</u> 1	<u>R</u> 7	<u>S</u> 61	<u>I</u> 6				
	E27	<u>A</u> 6	<u>D</u> 8	<u>E</u> 60	<u>G</u> 2	<u>H</u> 1	<u>I</u> 1	<u>K</u> 4	<u>L</u> 1	<u>N</u> 2	<u>Q</u> 5	<u>R</u> 1	<u>V</u> 2	
	S28	<u>A</u> 1	<u>D</u> 1	<u>G</u> 7	<u>H</u> 1	<u>I</u> 1	<u>K</u> 1	<u>N</u> 9	<u>P</u> 3	<u>R</u> 7	<u>S</u> 56	<u>I</u> 4	<u>V</u> 1	<u>Y</u> 1
	V29	<u>A</u> 11	<u>G</u> 6	<u>I</u> 3	<u>K</u> 1	<u>L</u> 9	<u>M</u> 6	<u>Q</u> 1	<u>R</u> 1	<u>V</u> 55				
	D30	<u>A</u> 3	<u>D</u> 59	<u>E</u> 9	<u>G</u> 3	<u>H</u> 3	<u>I</u> 1	<u>K</u> 1	<u>L</u> 1	<u>N</u> 6	<u>P</u> 1	<u>S</u> 1	<u>I</u> 2	<u>V</u> 3
	D31	<u>D</u> 77	<u>E</u> 13	<u>G</u> 2	<u>N</u> 1									
	L32	<u>I</u> 1	<u>L</u> 88	<u>M</u> 4										
	L33	<u>A</u> 1	<u>I</u> 5	<u>L</u> 64	<u>M</u> 1	<u>V</u> 22								
H34	<u>F</u> 1	<u>H</u> 87	<u>Y</u> 4	<u>S</u> 1										
HVR-L3	N96	<u>A</u> 2	<u>F</u> 6	<u>H</u> 1	<u>I</u> 3	<u>L</u> 47	<u>M</u> 3	<u>N</u> 2	<u>R</u> 2	<u>S</u> 2	<u>I</u> 4	<u>V</u> 2	<u>W</u> 16	<u>Y</u> 3
HVR-H3	M94	<u>A</u> 1	<u>E</u> 3	<u>G</u> 1	<u>M</u> 48	<u>Q</u> 10	<u>R</u> 24	<u>S</u> 8						

注: 最常观测到的氨基酸加上了框。

图 12

	所有观测到的改变 大鼠 Fib 504	人共有	所有观测到的氨基酸	有限扫描	广泛扫描观测到的氨基酸	软随机 (改变为 504)
CDR-L1	25	R	R			
		A	A	AGSTV		S
		S	S	GIKNPQRST		
	27	E	Q	ADEGHIKLNQRV	E Q	D
		S	S	ADGHIKNPRSTVY		DN
	29	V	I	AGIKLMQRV	V I	
CDR-L2	31	D	S	ADEGHIKLNPNSTV	D S A	
		F	N	DEGN	D N	S P N D
		Y	Y	ILM	L	I L
	33	L	L	AILMV		V
		H	A	FHYS	H	
CDR-L3	49	K	Y	KN	K N	
		Y	A	Y	Y	
	51	A	A			
	53	S	S	QS	Q S	
	55	I	E	SLR	S L	R
	S	S	EIKTV	I E K V	T	
CDR-L3	89	Q	Q			
	91	Q	Q	G	G	
	93	N	N			
	95	L	L			
	97	F	F	AFHILMNRSTVWY	N W Y R S A F H I L M N R S T V W Y	

图 13A

	所有观测到的改变 大鼠 Fib 504	人共有	所有观测到的氨基酸	有限扫描	广泛扫描观测到的氨基酸
CDR-H1	<u>26</u>	G	G		
	<u>28</u>	F	F	F	
	<u>30</u>	I	F	I	F
	<u>32</u>	N	S	N	N
	<u>34</u>	W	M	W	W
CDR-H2	<u>49</u>	G	S	G	G
	<u>51</u>	Y	V	DFVY	YVD
	<u>53</u>	I	I		
	<u>55</u>	S	S	Y	Y
	<u>57</u>	S	G	GS	S
	<u>59</u>	G	G		
	<u>61</u>	S	S	SY	S
	<u>63</u>	T	T		
	<u>65</u>	Y	Y	ADNT	N
	<u>67</u>	N	A	ADHP	P
CDR-H3	<u>93</u>	P	D		
	<u>95</u>	S	S	LV	L
	<u>97</u>	L	V	GS	S
	<u>99</u>	K	K		
	<u>#</u>	S	G		
	A	A	AEGMQRS	M	AEGMQRS
	M	R	T	T	
	T	G			
	G				
	S				
	S				
	G				
	Y	F			
	F	D			
	D	Y	FY	F	

图 13B

Fib 504 变体在 RPMI8866 细胞中同人 MAdCAM-1-Ig 结合的活性

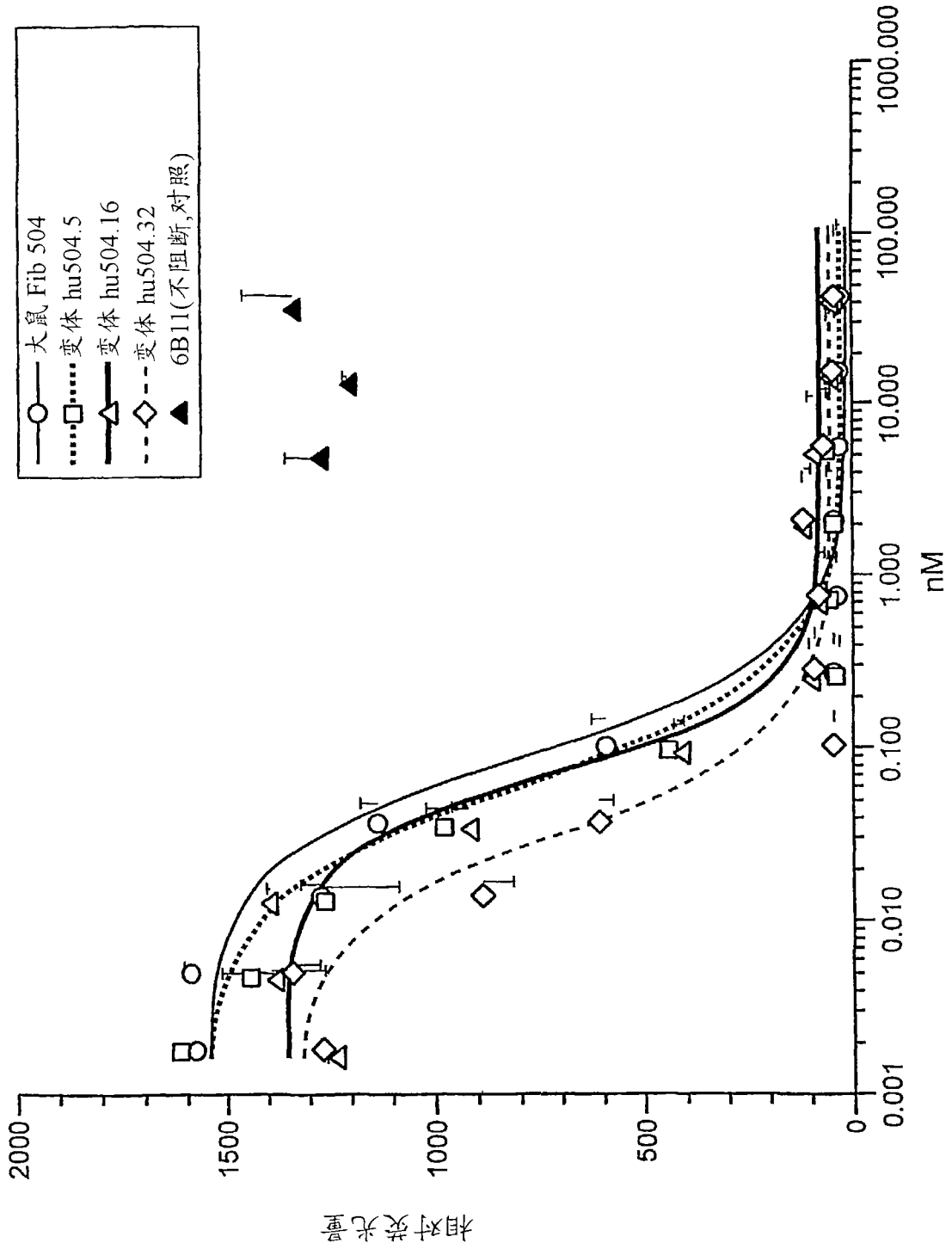


图 14

	位置		504.32R	氨基酸替换
	Kabat #	相应#	氨基酸	
HVR-L1	24	A1	R	
	25	A2	A	GSTV
	26	A3	S	G I K N P Q R T
	27	A4	E	V Q A D G H I K L N R
	28	A5	S	Y A D G H I K N P R T V
	29	A6	V	R I A G K L M Q
	30	A7	D	V S A E G H I K L N P S T
	31	A8	D	G N E T P S
	32	A9	L	Y I M
	33	A10	L	A I M V
	34	A11	H	Y F S
HVR-L2	49	B1	K	Y N
	50	B2	Y	
	51	B3	A	
	52	B4	S	D
	53	B5	Q	S
	54	B6	S	D L R
	55	B7	I	V E K T
	56	B8	S	
HVR-L3	89	C1	Q	
	90	C2	Q	
	91	C3	G	
	92	C4	N	
	93	C5	S	
	94	C6	L	
	95	C7	P	
	96	C8	N	V W Y R S T A F H I L M
	97	C9	T	

图 15A

	位置	504.32R	氨基酸替换	
	Kabat # 相应#	氨基酸		
HVR-H1	26	D1	G	
	27	D2	F	
	28	D3	F	
	29	D4	I	
	30	D5	T	
	31	D6	N	
	32	D7	N	
	33	D8	Y	
	34	D9	W	
	35	D10	G	
HVR-H2	49	E1	G	
	50	E2	Y	F V D
	51	E3	I	
	52	E4	S	
	53	E5	Y	
	54	E6	S	G
	55	E7	G	
	56	E8	S	
	57	E9	T	
	58	E10	S	Y
	59	E11	Y	
	60	E12	N	T A D
	61	E13	P	H D A
	62	E14	S	
	63	E15	L	V
	64	E16	K	
	65	E17	S	G
HVR-H3	93	F1	A	
	94	F2	R	M A E G Q S
	95	F3	T	
	96	F4	G	
	97	F5	S	
	98	F6	S	
	99	F7	G	
	100	F8	Y	
	k	F9	F	
	101	F10	D	
	102	F11	F	Y
重链 FR3	71		R	A T
	73		T	N
	78		F	A F L

图 15B

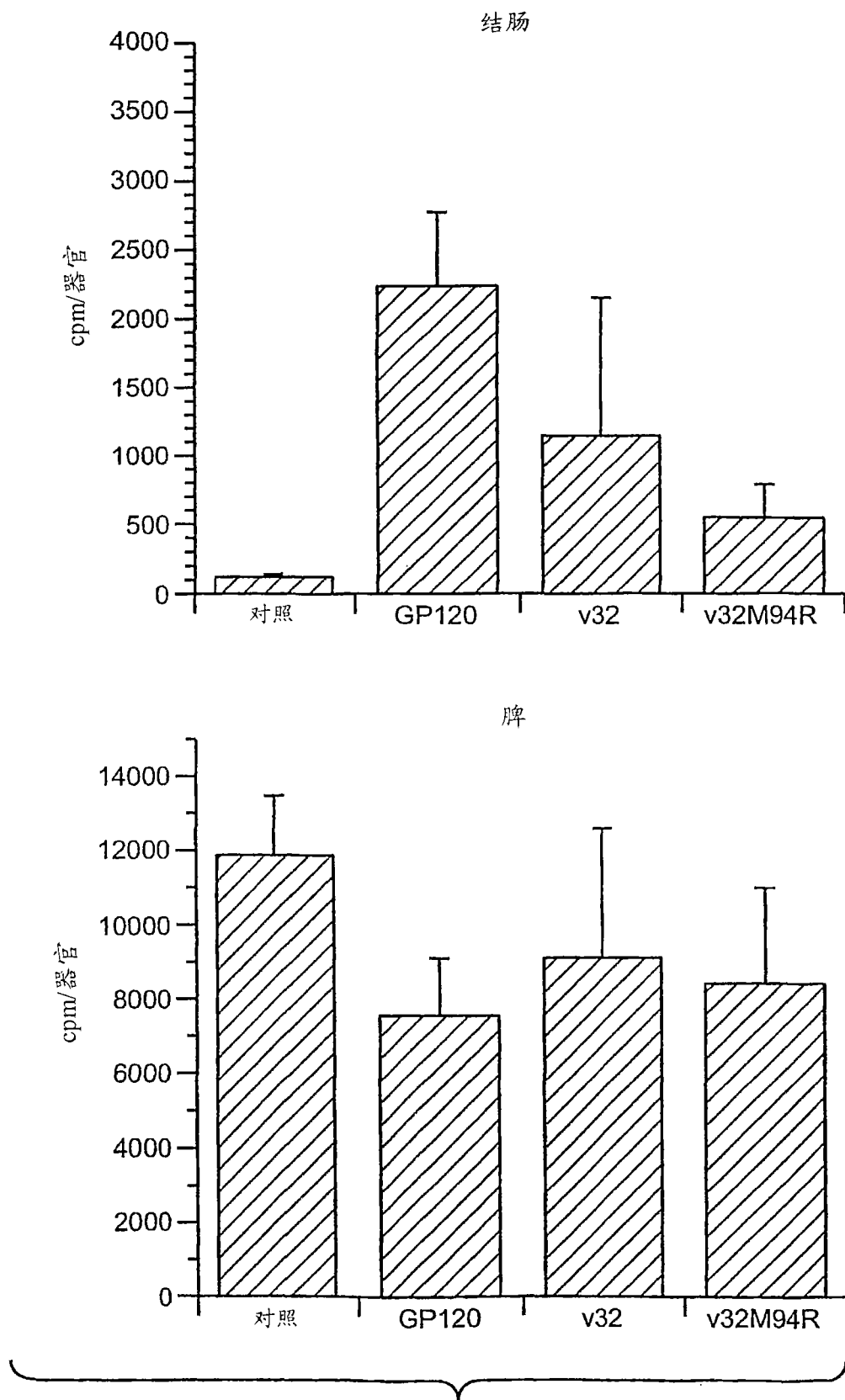


图 16