



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101970006 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 06

(21) 申请号 200980108185. 5

(22) 申请日 2009. 02. 04

(30) 优先权数据

61/026, 207 2008. 02. 05 US

61/095, 429 2008. 09. 09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 09. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/033042 2009. 02. 04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/100110 EN 2009. 08. 13

(83) 生物保藏信息

PTA-9377 2008. 07. 16

PTA-9378 2008. 07. 16

(73) 专利权人 百时美施贵宝公司

地址 美国新泽西

专利权人 辉瑞大药厂

(72) 发明人 S·L·本德 G·F·卡斯佩森

D·D·胡-洛维 蒋欣 李刚

M·A·诺斯 王建英 G·维克曼

P·布拉姆斯 黄海春 B·德沃克斯

陈海滨 D·M·棚町 K·托伊

扬岚 T·W·斯普劳尔 M·山中

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

C07K 16/28 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2004089988 A2, 2004. 10. 21, 全文.

W0 2005092073 A3, 2005. 10. 06, 全文.

W0 2007134876 A2, 2007. 11. 29, 全文.

Vanitha Ramakrishnan et al., preclinical evaluation of an anti- $\alpha 5 \beta 1$ integrin antibody as a novel anti-angiogenic agent. 《Journal of experimental therapeutics and oncology》. 2006, 第 5 卷第 273 - 286 页.

审查员 张蕊

权利要求书1页 说明书51页

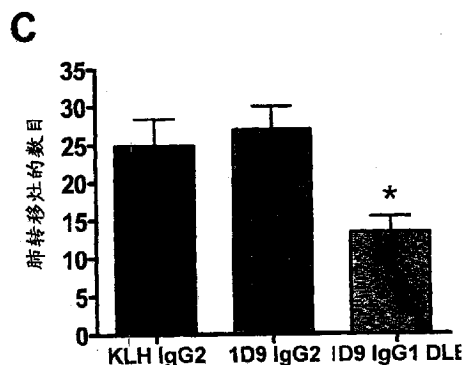
序列表17页 附图19页

(54) 发明名称

$\alpha 5 \beta 1$ 抗体和它们的用途

(57) 摘要

本公开内容提供了以高和亲力特异性结合整合蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 的分离的单克隆抗体, 特别地人单克隆抗体, 或其抗原结合部分。还提供了编码本公开内容的抗体的核酸分子、表达载体、宿主细胞和用于表达本公开内容的抗体的方法。还提供了包含抗体或其抗原结合部分的免疫缀合物、双特异性分子和药物组合物。本公开内容还提供了使用本文中描述的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体或其抗原结合部分治疗各种癌症的方法。



1. 能够结合整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 的分离的单克隆抗体,其包含:
 - (a) 由 SEQ ID NO :1 组成的重链可变区 CDR1 ;
 - (b) 由 SEQ ID NO :2 组成的重链可变区 CDR2 ;
 - (c) 由 SEQ ID NO :3 组成的重链可变区 CDR3 ;
 - (d) 由 SEQ ID NO :4 组成的轻链可变区 CDR1 ;
 - (e) 由 SEQ ID NO :5 组成的轻链可变区 CDR2 ;和
 - (f) 由 SEQ ID NO :6 组成的轻链可变区 CDR3。
2. 权利要求 1 的抗体,其包含:
 - (a) 由 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列组成的重链可变区 ;和
 - (b) 由 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列组成的轻链可变区。
3. 权利要求 1 或 2 的抗体,其中所述抗体是人全长 IgG1 抗体,并且其中所述抗体的 Fc 区域中包含丝氨酸 247 至天冬氨酸的突变 S247D、丙氨酸 338 至亮氨酸的突变 A338L,以及异亮氨酸 340 至谷氨酸的突变 I340E。
4. 组合物,其包含权利要求 1 至 3 的任一项的抗体以及可药用的载体。
5. 分离的核酸分子,其编码权利要求 1 至 3 的任一项的抗体的重链和轻链。
6. 包含权利要求 5 的核酸分子的表达载体。
7. 包含权利要求 6 的表达载体的宿主细胞。
8. 用于制备抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的方法,其包括在权利要求 7 的宿主细胞中表达所述抗体。
9. 权利要求 1-3 的任一项的抗体或权利要求 4 的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于抑制表达整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 的肿瘤细胞的生长。

$\alpha 5-\beta 1$ 抗体和它们的用途

[0001] 本申请要求对 2008 年 2 月 5 日提交的美国临时申请案 61/026,027 和 2008 年 9 月 9 日提交的美国临时申请案 61/095,429 (其两者以其全文通过引用合并入本文) 的优先权。

[0002] 领域

[0003] 本公开内容涉及结合 $\alpha 5 \beta 1$ 的抗体和其抗原结合部分。本公开内容还涉及编码此类抗体和抗原结合部分的核酸分子、制备 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体和抗原结合部分的方法、包含此类抗体和抗原结合部分的组合物和使用抗体、抗原结合部分和组合物的方法。

[0004] 背景

[0005] 整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 是结合纤连蛋白并且参与细胞附着和血管生成的异二聚体细胞表面蛋白。该异二聚体由 $\alpha 5$ 亚基和 $\beta 1$ 亚基组成。整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 称为“经典纤连蛋白受体”，其在基质附着、迁移、增殖、分化和存活中起着至关重要的作用。虽然几种整联蛋白结合纤连蛋白 (FN)，但 $\alpha 5 \beta 1$ 对于 FN 具有选择性，因为其需要 FN 的第 9 (PHSRN) 和第 10 (RGDS) III 型重复上的肽序列来进行配体识别和最佳相互作用。(Danen 等人 J. Biol. Chem. 270(37):21612-21618(1995); Redick 等人 J. Cell Biol. 149(2):521-527(2000); Takagi 等人 BMO J. 22:4607-4615(2003))。整联蛋白介导的细胞至 FN 的附着可触发钙流、激活酪氨酸和丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶以及肌醇脂质代谢，并且调控控制肌动蛋白细胞骨架和细胞周期进程的小 GTP 酶的 Rho 家族的活性。

[0006] 在大多数胚胎组织中观察到 $\alpha 5 \beta 1$ 的表达，但水平在出生后以与终末细胞分化一致的方式减少 (Muschler & Horwitz Development 113(1):327-337(1991))。在野生型成年小鼠中，表达主要存在于脉管系统和结缔组织中，虽然低水平的受体广泛分布。 $\alpha 5 \beta 1$ 和 FN 的表达在人肿瘤的血管上和在生长因子及细胞因子刺激的组织中得到显著地和协同地增强。血管生成细胞因子 (angiogenic cytokine) 例如 bFGF、VEGF, IL-8, TGF- β 和 TNF- α 在体外和体内上调内皮细胞上的 $\alpha 5 \beta 1$ 表达，然而此类分子在正常人血管和组织中以最低限度表达 (Kim 等人 Am. J. Path. 156(4):1345-62(2000); Enaida 等人 Fukushima J. Med. Sci 44(1):43-52(1998); Klein 等人 Mol Biol. Cell 4(10):973-982(1993))。

[0007] 高水平的 $\alpha 5 \beta 1$ 表达不限于脉管系统中，因为在许多类型的癌症中也频繁观察到肿瘤细胞表达 $\alpha 5 \beta 1$ 。肿瘤缺氧与增加的肿瘤 $\alpha 5 \beta 1$ 表达相关联 (Mousa 等人 J. Cell. Biochem. 74:135-143(1999))。整联蛋白据认为对于肿瘤内渗入新形成的毛细血管和外渗至远距离部位，从而导致肿瘤扩散和转移性疾病是非常重要的。总的说来， $\alpha 5 \beta 1$ 的表达模式与在促进癌症 (通过介导基质和肿瘤细胞的活性) 中的多个作用相符。多种临床研究已使肿瘤细胞上 $\alpha 5 \beta 1$ 的上调与人黑素瘤、口腔鳞状细胞癌和 B 细胞白血病的进展相关联 (Jin & Varner, Br. J. Cancer 90:561-565(2004); Danen 等人 Histopathology 24(3):249-256(1994); Shinohara 等人, Am. J. Clin. Pathol 111(1):75-88(1999))。

[0008] 概述

[0009] 本公开内容提供了展示对人整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 的高亲和力结合的分离的单克隆抗体，特别地人单克隆抗体。本公开内容中描述的抗体通常是人抗体，虽然在备选情况下抗体

可以是鼠抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

[0010] 在一个方面,本公开内容涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中抗体:(a) 以 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更小的 K_D 结合人整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$;和 (b) 能够诱导抗体依赖性细胞毒性。例如,在一种情况下,抗体属于能够诱导 ADCC 的亚类例如 IgG1 或 IgG3。在另一种情况下,ADCC 活性是向 Fc 区域导入糖修饰例如改变的糖基化模式(与天然糖模式相比较)的结果。

[0011] 在某些情况下,抗体以 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更小, $2 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更小, $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更小, $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小, $4 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小, $3 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小,或 $2.7 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小的 K_D 结合人整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 。

[0012] 在另外的方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中抗体:(a) 以 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更小的 K_D 结合人整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$;和 (b) 显示与可比较的抗体相比增强的 ADCC 活性。例如,在一种情况下,与野生型 Fc 区域相比较,具有增强的 ADCC 活性的抗体在 Fc 区域中包含至少一个突变,并且增强的 ADCC 活性是相对于相同的但包含野生型 Fc 区域的抗体而言的。在某些实例中,抗体以 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更小, $2 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更小, $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更小, $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小, $4 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小, $3 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小或 $2.7 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小的 K_D 结合人整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 。在另外的实例中,相对于可比较的抗体,抗体显示增强的 ADCC 活性,所述 ADCC 活性与可比较的抗体相比,为至少 1.1 倍、至少 1.2 倍、至少 1.3 倍、至少 1.5 倍、至少 2 倍、至少 3 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、至少 20 倍、至少 30 倍、至少 40 倍、至少 50 倍、至少 100 倍、至少 200 倍、至少 500 倍或至少 1000 倍,其中可比较的抗体是相同的但具有野生型 Fc 区域的抗体。

[0013] 在另外的方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中抗体:(a) 以 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更小的 K_D 结合人整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$;和 (b) 与野生型 Fc 区域相比较在 Fc 区域中包含至少一个突变。例如,在一种情况下,抗体的亚类是 IgG1 并且 IgG1 亚类的 Fc 区域中至少一个氨基酸被突变。在另外的实例中,至少一个突变在 IgG1 亚类的 Fc 区域中的位点丝氨酸 247、丙氨酸 338 或异亮氨酸 340 上发生。在另外的实例中,至少一个突变选自 S247D、A338L 和 I340E。在另外的实例中,抗体包含突变 S247D、A338L 和 I340E。

[0014] 本公开内容的另外的方面是分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中该抗体与包含下列的抗体交叉竞争或竞争与人整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 的结合:(a) 重链可变区,其含有 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列,或其保守修饰形式;和 (b) 轻链可变区,其含有 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列,或其保守修饰形式。

[0015] 本公开内容的另外的方面是分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含作为人 V_H 4-39 基因的产物或源自人 V_H 4-39 基因的重链可变区,其中抗体特异性结合人整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 。

[0016] 本公开内容的另外的方面是分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含作为人 V_L L6 基因的产物或源自人 V_L L6 基因的轻链可变区,其中抗体特异性结合人整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 。

[0017] 在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:1 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR1。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:2 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR2。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:3 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR3。在另一个方面,本公开内容

提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:4 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR1。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:5 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR2。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:6 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR3。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含:

- [0018] (a) 含有 SEQ ID NO:1 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR1;
- [0019] (b) 含有 SEQ ID NO:2 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR2;
- [0020] (c) 含有 SEQ ID NO:3 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR3;
- [0021] (d) 含有 SEQ ID NO:4 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR1;
- [0022] (e) 含有 SEQ ID NO:5 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR2;和
- [0023] (f) 含有 SEQ ID NO:6 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR3。

[0024] 在另外的方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列或其保守修饰形式的重链可变区。例如,本公开内容提供了包含重链可变区的抗体或其抗原结合部分,所述重链可变区与 SEQ ID NO:7 中所示的氨基酸序列至少 80%,至少 85%,至少 90%,至少 95%,至少 97%,至少 98%或至少 99%同一。在另外的方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列或其保守修饰形式的轻链可变区。例如,本公开内容提供了包含轻链可变区的抗体或其抗原结合部分,所述轻链可变区与 SEQ ID NO:8 中所示的氨基酸序列至少 80%,至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98%或至少 99%同一。在另外的方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列或其保守修饰形式的重链可变区和含有 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列或其保守修饰形式的轻链可变区。例如,本公开内容提供了包含重链可变区和轻链可变区的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,所述重链可变区与 SEQ ID NO:7 中所示的氨基酸序列至少 80%,至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98%或至少 99%同一,所述轻链可变区与 SEQ ID NO:8 中所示的氨基酸序列至少 80%,至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98%或至少 99%同一。

[0025] 在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:13 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR1。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:14 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR2。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:15 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR3。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:16 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR1。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:17 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR2。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:18 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR3。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含:

- [0026] (a) 含有 SEQ ID NO:13 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR1;

- [0027] (b) 含有 SEQ ID NO:14 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR2 ;
- [0028] (c) 含有 SEQ ID NO:15 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR3 ;
- [0029] (d) 含有 SEQ ID NO:16 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR1 ;
- [0030] (e) 含有 SEQ ID NO:17 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR2 ;和
- [0031] (f) 含有 SEQ ID NO:18 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR3。

[0032] 在另外的方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列或其保守修饰形式的重链可变区。在另外的方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列或其保守修饰形式的轻链可变区。在另外的方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列或其保守修饰形式的重链可变区和含有 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列或其保守修饰形式的轻链可变区。

[0033] 在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:23 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR1。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:24 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR2。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:25 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR3。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:26 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR1。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:27 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR2。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:28 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR3。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含:

- [0034] (a) 包含 SEQ ID NO:23 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR1 ;
- [0035] (b) 包含 SEQ ID NO:24 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR2 ;
- [0036] (c) 包含 SEQ ID NO:25 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR3 ;
- [0037] (d) 包含 SEQ ID NO:26 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR1 ;
- [0038] (e) 包含 SEQ ID NO:27 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR2 ;和
- [0039] (f) 包含 SEQ ID NO:28 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR3。

[0040] 在另外的方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列或其保守修饰形式的重链可变区。在另外的方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列或其保守修饰形式的轻链可变区。在另外的方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列或其保守修饰形式的重链可变区和含有 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列或其保守修饰形式的轻链可变区。

[0041] 在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:33 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR1。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:34 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR2。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:35 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR3。在另一个方面,本公

开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:36 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR1。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:37 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR2。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:38 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR3。在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含:(a) 包含 SEQ ID NO:33 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR1;(b) 包含 SEQ ID NO:34 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR2;(c) 包含 SEQ ID NO:35 或其保守修饰形式的重链可变区 CDR3;(d) 包含 SEQ ID NO:36 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR1;(e) 包含 SEQ ID NO:37 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR2;和 (f) 包含 SEQ ID NO:38 或其保守修饰形式的轻链可变区 CDR3。

[0042] 在另外的方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列或其保守修饰形式的重链可变区。在另外的方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:40 的氨基酸序列或其保守修饰形式的轻链可变区。在另外的方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含有 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列或其保守修饰形式的重链可变区和含有 SEQ ID NO:40 的氨基酸序列或其保守修饰形式的轻链可变区。

[0043] 在另外的方面,提供了分离的抗体或其抗原结合部分,其结合与本文中公开的任何抗体相同的人整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 上的表位和 / 或与这样的抗体竞争对人整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 的结合。

[0044] 在一个实施方案中,本公开内容提供了以保藏号 PTA-9377 保藏在 ATCC 的材料。在另一个实施方案中,本公开内容提供了以保藏号 PTA-9378 保藏在 ATCC 的材料。在另一个实施方案中,本公开内容提供了包含以保藏号 PTA-9377 保藏在 ATCC 的重链可变区的分离的抗体。在另一个实施方案中,本公开内容提供了包含以保藏号 PTA-9378 保藏在 ATCC 的轻链可变区的分离的抗体。在另一个实施方案中,本公开内容提供了包含以保藏号 PTA-9377 保藏在 ATCC 的重链可变区的分离的抗体,但其中已在 VH 区域产生了种系突变 I30S 和 N33S。在另外的实施方案中,本公开内容提供了包含分别以保藏号 PTA-9377 和 PTA-9378 保藏在 ATCC 的重链和轻链可变区的分离的抗体,或其中已在 VH 区中产生了种系突变 I30S 和 N33S 的所述抗体。在另外的实施方案中,本公开内容提供了分离的抗体,所述分离的抗体包含以保藏号 PTA-9377 保藏在 ATCC 的重链可变区的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区,或当所述重链可变区包含种系突变 I30S 和 N33S 时包含所述 CDR1、CDR2 和 CDR3。在另外的实施方案中,本公开内容提供了分离的抗体,所述分离的抗体包含以保藏号 PTA-9378 保藏在 ATCC 的轻链可变区的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区。在另外的实施方案中,本公开内容提供了分离的抗体,所述分离的抗体包含分别以保藏号 PTA-9377 和 PTA-9378 保藏在 ATCC 的重链和轻链可变区的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区和重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区,或当所述重链可变区包含种系突变 I30S 和 N33S 时,包含所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 区。

[0045] 本公开内容的抗体可以是,例如全长抗体,例如 IgG1 或 IgG4 亚类的全长抗体。备选地,抗体可以是抗体片段例如 Fab 或 Fab' 2 片段或单链抗体。在一种情况下,本公开内容提供了上述任何抗体,其是亚类 IgG1 的人全长抗体,其中 IgG1 亚类的 Fc 区域中的至少一个氨基酸被突变。在另外的情况下,至少一个突变发生在位点丝氨酸 247、丙氨酸 338 或

异亮氨酸 340 上。在另外的情况下,至少一个突变选自 S247D、A338L 和 I340E。在另外的情况下,抗体包含突变 S247D、A338L 和 I340E。

[0046] 在另外的方面,本公开内容提供了包含 SEQ ID NO :9 或其保守修饰形式中显示的重链的分离的单克隆抗体。例如,抗体包含与 SEQ ID NO :9 中所示的氨基酸序列至少 80%,至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98%或至少 99%同一的重链。在另外的方面,本公开内容提供了包含 SEQ ID NO :10 或其保守修饰形式中显示的轻链的分离的单克隆抗体。例如,抗体包含与 SEQ ID NO :10 中所示的氨基酸序列至少 80%,至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98%或至少 99%同一的轻链。在另外的方面,本公开内容提供了包含 SEQ ID NO :9 或其保守修饰形式中显示的重链和 SEQ ID NO :10 或其保守修饰形式中显示的轻链的分离的单克隆抗体。例如,抗体包含与 SEQ ID NO :9 中显示的氨基酸序列至少 80%,至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98%或至少 99%同一的重链和与 SEQ ID NO :10 中显示的氨基酸序列至少 80%,至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98%或至少 99%同一的轻链。

[0047] 在一些实施方案中,所述的本公开内容的任何抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的重链的 C 末端赖氨酸被切割,从而不存在。例如,在一些实施方案中本公开内容的抗体包含 SEQ ID NO :43 中显示的 IgG1 重链恒定区,但其中 C 末端赖氨酸不存在。在多种情况下,抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的重链和轻链可任选地包含信号序列。

[0048] 在另外的方面,本公开内容提供了包含本文中描述的任何抗体或其抗原结合部分和可药用载体的组合物。

[0049] 在另外的方面,本公开内容提供了包含连接至治疗剂的本文中描述的任何抗体或其抗原结合部分的免疫缀合物。在一种情况下,治疗剂是细胞毒素或放射性同位素。在另外的方面,本公开内容提供了包含本文中描述的任何免疫缀合物和可药用载体的组合物。本公开内容还提供了包含连接至第二功能性部分的抗体或其抗原结合部分的双特异性分子,所述第二功能性部分具有与所述抗体或其抗原结合部分不同的结合特异性。

[0050] 还提供了包含本公开内容的抗体或其抗原结合部分,或免疫缀合物或双特异性分子以及可药用载体的组合物。

[0051] 本公开内容还包括编码抗体或其抗原结合部分的核酸分子以及包含此类核酸的表达载体和包含此类表达载体的宿主细胞。一个方面,例如,是包含 SEQ ID NO :11 中显示的序列或其保守修饰形式的分离的核酸分子,或表达载体。另外的方面是包含 SEQ ID NO :12 中显示的序列或其保守修饰形式的分离的核酸分子或表达载体。另外的方面是包含选自 SEQ ID NO :21、22、31、32、41 和 42 的序列或其保守修饰形式的分离的核酸分子或表达载体。本公开内容还提供了包含人免疫球蛋白重链和轻链转基因的转基因小鼠(其中小鼠表达本公开内容的抗体)以及从这样的小鼠制备的杂交瘤(其中杂交瘤产生本公开内容的抗体)。

[0052] 本公开内容还提供了包含本文中所述的任何表达载体的宿主细胞。

[0053] 在另外的方面,本公开内容提供了用于制备抗整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的方法,其包括在本文中描述的任何宿主细胞中表达抗体和从宿主细胞分离抗体。

[0054] 在另外的方面,本公开内容提供了用于抑制表达整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 的肿瘤细胞生长的方法,所述方法包括将细胞与抗体或其抗原结合部分(其以 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更小的 K_D 结合

人整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 并且能够诱导抗体依赖性细胞毒性) 接触。在一种情况下, 抗体是全长人抗体。在另外的情况下, 抗体或其抗原结合部分经工程改造增强了其诱导抗体依赖性细胞毒性的能力。在另外的情况下, 通过 Fc 区域中至少一个氨基酸残基的突变来获得增强。

[0055] 在另外的方面, 本公开内容提供了抑制表达整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 的肿瘤细胞生长的方法, 包括将细胞与有效地抑制肿瘤细胞生长的量的本文中所述的任何抗体或其抗原结合部分接触。

[0056] 在另外的方面, 本公开内容提供了本文中描述的任何抗体或其抗原结合部分用于制造用于治疗异常细胞生长的药剂的用途。在另外的方面, 本公开内容提供了本文中描述的任何抗体或其抗原结合部分, 其用于治疗 / 或诊断异常细胞生长。在该方法的一个实施方案中, 异常细胞生长是癌症, 包括, 但不限于, 间皮瘤、肝胆管 (肝和胆管) 肿瘤、原发性或继发性 CNS 肿瘤、原发性或继发性脑肿瘤、肺癌 (NSCLC 和 SCLC)、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤或眼内黑素瘤、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肛门区域癌、胃癌、胃肠 (胃、结直肠和十二指肠) 癌、乳腺癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌 (carcinoma of the vulva)、何杰金氏病、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、睾丸癌、慢性或急性白血病、慢性髓性白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统 (CNS) 肿瘤、原发性 CNS 淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、脊轴肿瘤 (spinal axis tumor)、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、肾上腺皮质癌症、胆囊癌 (gall bladder cancer)、多发性骨髓瘤、胆管癌、纤维肉瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤或一种或多种上述癌症的组合。

[0057] 本公开内容还提供了基于本文中提供的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的序列制造“第二代”抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的方法。例如, 本公开内容提供了用于制备抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的方法, 其包括: (a) 提供: (i) 包含 SEQ ID NO: 1、13、23 或 33 中显示的 CDR1 序列、SEQ ID NO: 2、14、24 或 34 中显示的 CDR2 序列和 / 或 SEQ ID NO: 3、15、25 或 35 中显示的 CDR3 序列的重链可变区抗体序列; 和 / 或 (ii) 包含 SEQ ID NO: 4、16、26 或 36 中显示的 CDR1 序列、SEQ ID NO: 5、17、27 或 37 中显示的 CDR2 序列和 / 或 SEQ ID NO: 6、18、28 或 38 中显示的 CDR3 序列的轻链可变区抗体序列; (b) 改变重链可变区抗体序列和 / 或轻链可变区抗体序列中的至少一个氨基酸残基以产生至少一个改变的抗体序列; 和 (c) 将改变的抗体序列表达为蛋白质。

[0058] 根据下列不应当被解释为限定的详细描述和实施例, 本公开内容的其他特征和有利方面将变得显然。在整个本说明书中引用的所有参考资料、Genbank 条目 (Genbank entry)、专利和公布的专利申请的内容明确地通过引用合并入本文。

[0059] 附图概述

[0060] 图 1A 显示 22B5 重链可变区的 DNA 序列 (SEQ ID NO: 11); 图 1B 显示 22B5 重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 7) - CDR 区以下划线标示; 图 1C 显示 22B5 轻链可变区的 DNA 序列 (SEQ ID NO: 12); 图 1D 显示 22B5 轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 8) - CDR 区以下划线标示; 图 1E 显示 24C7 重链可变区的 DNA 序列 (SEQ ID NO: 21); 图 1F 显示 24C7 重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 19) - CDR 区以下划线标示; 图 1G 显示 24C7 轻链可变区的 DNA 序列 (SEQ ID NO: 22);

[0061] 图 1H 显示 24C7 轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 20) - CDR 区以下划线标示; 图 1I 显示 1D9 重链可变区的 DNA 序列 (SEQ ID NO: 31);

[0062] 图 1J 显示 1D9 重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :29)-CDR 区以下划线标示。图 1K 显示 1D9 轻链可变区的 DNA 序列 (SEQ ID NO :32) ;

[0063] 图 1L 显示 1D9 轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :30)-CDR 区以下划线标示 ; 图 1M 显示 2D2 重链可变区的 DNA 序列 (SEQ ID NO :41) ;

[0064] 图 1N 显示 2D2 重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :39)-CDR 区以下划线标示 ; 图 1O 显示 2D2 轻链可变区的 DNA 序列 (SEQ ID NO :42) ;

[0065] 图 1P 显示 2D2 轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :40)-CDR 区以下划线标示 ; 图 1Q 显示 IgG1 重链恒定区的氨基酸序列, 突变 S247D、A338L 和 I340E 以下划线标示 ; 和图 1R 显示 IgG1 轻链恒定区的氨基酸序列。

[0066] 图 2 显示 22B5 重链可变结构域 (V_H) 与相应的种系序列的比对。还显示的是 22B5 轻链可变结构域 (V_L) 与相应的种系序列的比对。CDR 区域以下划线标示, 相同的残基由虚线表示, 点表示缺失。

[0067] 图 3 显示通过在固定的 22B5/DLE 的上方注射不同浓度的 $\alpha 5 \beta 1$ 重组细胞外结构域获得的传感图的叠加。在 4.0mM CaCl_2 存在的情况下收集该数据。注射的顺序是从低浓度至高浓度。

[0068] 图 4 显示通过 FACS 获得的 22B5/DLE 对 HUVEC 的剂量依赖性结合。

[0069] 图 5 显示比较人与小鼠 $\text{Fc}\gamma$ 受体的平衡解离常数, " wt " 是指 22B5 野生型 IgG1 ; " DLE " 是指 22B5/DLE。

[0070] 图 6 显示 HUVEC 细胞附着阻断测定的结果。结果显示 22B5 和不同亚类的变体以及阴性对照 (BHA2 IgG1) 对 HUVEC 附着至纤连蛋白的抑制的水平。还显示了计算的 IC_{50} 值。

[0071] 图 7 显示通过 Western 印迹法测量的 HUVEC 和 20 个肿瘤细胞系的人 $\alpha 5$ 表达。

[0072] 图 8 显示由 22B5/DLE 诱导的体外 ADCC (与 22B5wt IgG1 相比)。图 8A 显示测量在人 PBMC 存在的情况下通过 22B5/DLE 和 22B5wt IgG1 产生的 U87MG 细胞的 ADCC 的基于 LDH 的检测测定。图 8B 显示测量在人 PBMC 存在的情况下通过 22B5/DLE 和 22B5wt IgG1 产生的 HUVEC 的 ADCC 的基于 ToxiLight 的检测测定。

[0073] 图 9 显示基于 LDH 的检测测定, 该检测测定显示在广泛的抗原表达水平上高于 wt 22B5 IgG1 的来自 22B5/DLE 的显著的 ADCC 增强。

[0074] 图 10 显示 A549-Luc 实验性转移模型中 22B5/DLE 的抑制活性。图 10A : 在第 8 周通过 BLI 测量的肺转移体积 (对于对照组 $n = 11$, 对于 22B5 IgG2 组 $n = 14$ 以及对于 22B5/DLE 组 $n = 12$)。图 10B : 给药后 22B5IgG2 处理组中肺肿瘤的再生长停止。相比之下, 22B5/DLE 处理组几乎不显示再生长。图 10C : 各处理组的动物存活率的 Kaplan-Meier 曲线 (终点 = BLI 1×10^8 个光子 / 秒), $p < 0.0001$, 对照媒介物组与所有其他组比较, 以及 $p < 0.05$, 22B5/DLE 与 22B5 IgG2 组之间的比较。

[0075] 图 11 显示通过 FACS 获得的 1D9、1D9/DLE、24C7/DLE、2D2/DLE、22B5 和 22B5/DLE 对 HUVEC 的剂量依赖性结合。

[0076] 图 12 显示由 1D9、1D9/DLE、2D2/DLE、22B5/DLE 和 24C7/DLE 诱导的体外 ADCC。

[0077] 图 13 显示转移性黑素瘤的同基因模型 (syngeneic model) 中 1D9/DLE 的 ADCC 依赖性抗肿瘤功效。图 13A : 切取自所有组的肺的大体外观 (gross appearance)。图 13B : 肺重量的定量 (* $p < 0.05$, 1D9 IgG1DLE 对 1D9 IgG2)。图 13C : 肺表面上可见的转移集落的

数目的定量。使用 ANOVA 和 Bonferroni' s 多重比较检验进行统计分析 (*p < 0.05, 1D9 IgG1 DLE 对 1D9 IgG2 ; *p < 0.05, 1D9 IgG1DLE 对抗 KLH IgG2)。

[0078] 详细描述

[0079] 本公开内容涉及以高和亲力特异性结合 $\alpha 5 \beta 1$ 的分离的单克隆抗体, 特别地人单克隆抗体。在某些情况下, 本公开内容的抗体来源于特定的重链和轻链种系序列和 / 或包含特定的结构特征例如含有特定氨基酸序列的 CDR 区。本公开内容提供了分离的抗体、制备此类抗体的方法、包含此类抗体的免疫缀合物和双特异性分子以及包含本公开内容的抗体、免疫缀合物或双特异性分子的药物组合物。本公开内容还涉及使用抗体例如检测 $\alpha 5 \beta 1$ 以及治疗与 $\alpha 5 \beta 1$ 的表达相关的疾病例如异常细胞生长 (例如癌症) 的方法。因此, 本公开内容还提供了使用抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体或其抗原结合部分治疗各种类型的异常细胞生长例如癌症的方法。

[0080] 为了可以更容易地理解本公开内容, 首先定义某些术语。另外的定义示于整个详细描述中。

[0081] 除非在本文中另外定义, 否则与本公开内容结合使用的科学和技术术语将具有本领域技术人员通常所理解的意义。此外, 除非上下文另外要求, 否则单数术语将包括复数并且复数术语将包括单数。一般地, 结合本文中描述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学和杂交使用的命名和技术是本领域内熟知的, 且常用于本领域。

[0082] 除非另外指出, 否则通常按照本领域内熟知的和在整个本说明书中引用和论述的各种一般和更特别的参考资料中描述的方法进行本公开内容的方法和技术。此类参考资料包括, 例如, Sambrook 和 Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Approach*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2001), Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (2002), 以及 Harlow 和 Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1990)。如在本领域通常进行的或如本文中描述的, 按照厂商的说明书进行酶促反应和纯化技术。结合本文中描述的分析化学、合成有机化学以及医学和药物化学使用的命名以及实验室方法和技术是本领域内熟知的, 且常用于本领域。标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及患者的治疗。

[0083] 如本文中所使用的, 每一个下列术语在该部分具有与其相关的意义。

[0084] 冠词“a”和“an”在本文中用于指一个或多于一个 (即, 至少一个) 冠词的语法对象。例如, “an element”是指一个元素或多于一个元素。

[0085] 如本文中所使用的, 20 个常规氨基酸和它们的缩写遵从习惯用法。参见 *Immunology-A Synthesis* (第 2 版, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))。

[0086] 术语“ $\alpha 5 \beta 1$ ”和“整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ ”可互换使用, 并且包括人 $\alpha 5 \beta 1$ 的变体、同种型和物种同源物。天然人 $\alpha 5 \beta 1$, 例如, 由 $\alpha 5$ 亚基 (其来源于随后切割成通过二硫键连接的两条链的前体序列) (Genbank 登录号 P08648) 和 $\beta 1$ 亚基 (其来源于随后加工成熟形式的前体序列) (Genbank 登录号 P05556-1) 组成。 $\beta 1$ 亚基已知以通过选择性剪接产生的数个同种型的形式存在 (参见, 例如, Genbank 登录号 P05556-2, P05556-3, P05556-4

和 P05556-5)。本公开内容的人 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体可以,在某些情况下,与来自除人以外的物种的 $\alpha 5 \beta 1$ 交叉反应。在其他情况下,抗体可以完全特异于人 $\alpha 5 \beta 1$,且可以不展示物种或其他类型的交叉反应性。

[0087] “免疫应答”,如本领域技术人员所理解的,包括,但不限于,任何可检测的辅助 T 细胞或细胞毒性 T 细胞应答的抗原特异性或同种异体 (allogenic) 激活、抗体的产生、T 细胞介导的变态反应的激活等。该术语包括例如,淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞和由上述细胞或肝产生的可溶性大分子 (包括抗体、细胞因子和补体) 的作用,所述作用导致对侵入的病原体、被病原体感染的细胞或组织、癌性细胞或在自身免疫或病理性炎症的情况下正常人细胞或组织的选择性损伤、破坏或从人体清除。

[0088] “信号转导途径”是指在信号从细胞的一个部分传递至细胞的另一部分中起作用的许多信号转导分子之间的生物化学关系。如本文中所使用的,短语“细胞表面受体”包括,例如,能够接收信号并且将这样的信号传递穿过细胞质膜的分子和复合物。本公开内容的“细胞表面受体”的实例是 $\alpha 5 \beta 1$ 整联蛋白。

[0089] 术语“抗体”,如本文中提及的,包括完整抗体和其任何抗原结合片段 (即,“抗原结合部分”) 或单链。“抗体”是指包含通过二硫键链间连接的至少两条重 (H) 链和两条轻 (L) 链的糖蛋白或其抗原结合部分。各重链由重链可变区 (在本文中缩写为 V_H) 和重链恒定区组成。重链恒定区由 3 个结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 组成。各轻链由轻链可变区 (在本文中缩写为 V_L) 和轻链恒定区组成。轻链恒定区由 1 个结构域 C_L 组成。 V_H 和 V_L 区还可进一步细分成与较保守的区域 (称为构架区 (FR)) 相间的称为互补决定区 (CDR) 的高变区。各 V_H 和 V_L 由 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成,其以下列顺序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基端至羧基端排列。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白对宿主组织或因子 (包括免疫系统的各种细胞 (例如效应细胞) 和经典补体系统的第一补体 (C1q)) 的结合。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过大约 12 个或更多个氨基酸的“J”区连接,重链还包括大约 10 个或更多个氨基酸的“D”区。一般参见, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 第 2 版, Raven Press, N. Y. (1989))。

[0090] 术语抗体的“抗原结合部分” (或简称“抗体部分”),如本文中所使用的,是指保留特异性结合抗原 (例如, $\alpha 5 \beta 1$) 的能力的一个或多个抗体片段。已显示可通过全长抗体的片段来进行抗体的抗原结合功能。术语抗体的“抗原结合部分”包括的结合片段的实例包括 (i) Fab 片段,由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_{H1} 结构域组成的单价片段; (ii) $F(ab')_2$ 片段,包含通过铰链区上的二硫桥连接的 2 个 Fab 片段的双价片段; (iii) Fd 片段,其由 V_H 和 C_{H1} 结构域组成; (iv) Fv 段,其由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成, (v) dAb 片段 (Ward 等人, (1989) *Nature* 341:544-546), 其由 V_H 结构域组成; 和 (vi) 分离的互补决定区 (CDR)。此外,尽管 Fv 片段的两个结构域 V_L 和 V_H 由分开的基因编码,但可使用重组方法,通过合成的连接体将它们连接起来,所述合成的连接体使得它们能够形成其中 V_L 和 V_H 部分配对形成单价分子的单个蛋白链 (称为单链 Fv (scFv); 参见例如, Bird 等人 (1988) *Science* 242:423-426; 和 Huston 等人 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)。这样的单链抗体也意欲包括在术语抗体的“抗原结合部分”中。这些抗体片段可使用任何合适的技术,包括本领域技术人员已知的常规技术获得,并且可以以与对于完整抗体所进行的相同的方式就效用筛选片段。

[0091] “分离的抗体”，如本文中所使用的，意指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体（例如，特异性结合 $\alpha 5 \beta 1$ 的分离的抗体基本上不含特异性结合除了 $\alpha 5 \beta 1$ 外的抗原的抗体）。然而，特异性结合 $\alpha 5 \beta 1$ 的分离的抗体可以具有与其他抗原例如来自其他物种的 $\alpha 5 \beta 1$ 分子的交叉反应性。此外，分离的抗体可以基本上不含其他细胞材料和/或化学药品。

[0092] 术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”，如本文中所使用的，是指单分子组成的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物展示对于特定表位的单结合特异性和亲和力。

[0093] 术语“人抗体”或“完全人抗体”，如本文中所使用的，意在包括具有其中构架区和 CDR 区都来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区的抗体。此外，如果抗体包含恒定区，则恒定区也来源于人种系免疫球蛋白序列。本公开内容的人抗体或其抗原结合部分可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如，由体外随机或定点诱变或由体内体细胞突变导入的突变）。然而，术语“人抗体”，如本文中所使用的，不希望包括其中已将来源于另一哺乳动物物种例如小鼠的种系的 CDR 序列移植至人构架序列的抗体。

[0094] 术语“人单克隆抗体”或“完全人单克隆体”是指展示单结合特异性的抗体，所述抗体具有其中构架区和 CDR 区都来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区。在一个实施方案中，人单克隆抗体由包含从转基因非人动物例如转基因小鼠（其具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组）获得的 B 细胞的杂交瘤产生，其中 B 细胞被融合至永生化细胞。

[0095] 术语“重组人抗体”，如本文中所使用的，包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的所有人抗体，例如 (a) 从人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体动物（例如小鼠）或由其制备的杂交瘤（在下文中进一步描述）分离的抗体，(b) 从经转化表达人抗体的宿主细胞，例如从转染瘤分离的抗体，(c) 从重组组合人抗体文库分离的抗体，和 (d) 通过任何其他方法制备、表达、产生或分离的抗体，所述方法牵涉人免疫球蛋白基因序列与其他 DNA 序列的拼接。此类重组人抗体具有其中构架区和 CDR 区来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区。然而，在某些实施方案中，可使此类重组人抗体经历体外诱变（或，当使用人 Ig 序列的转基因动物时，体内体细胞诱变），从而重组抗体的 V_H 和 V_L 区的氨基酸序列是这样的序列，其来源于人种系 V_H 和 V_L 序列且与其相关，但可能不天然地存在于体内人抗体种系库 (repertoire) 中。

[0096] 如本文中所使用的，“同种型”或“类型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类型（例如，IgM 或 IgG）。抗体的恒定结构域不参与对抗原的结合，但展示不同的效应子功能。取决于重链恒定区的氨基酸序列，可将给定的人抗体或免疫球蛋白分配至 5 个主要类型的免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM 中的一个类型。不同类型的免疫球蛋白的结构和三维构型是熟知的。在各种人免疫球蛋白类型中，只有人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 和 IgM 已知活化补体。人 IgG1 和 IgG3 已知介导人中的 ADCC。

[0097] 如本文中所使用的，“亚类”是指重链恒定区基因的同种型中的进一步分类，例如，IgG 同种型中的 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚类。

[0098] 如本文中所使用的，术语“化合物”或“药物化合物”包括抗体、其抗原结合部分、免疫缀合物和双特异性分子。

[0099] 短语“识别抗原的抗体”和“特异于抗原的抗体”在本文中可以与术语“特异性结合抗原的抗体”互换使用。

[0100] 术语“抗体依赖性细胞毒性”或“ADCC”是指细胞介导的反应,其中非特异性细胞毒性细胞(例如NK细胞、嗜中性粒细胞、巨噬细胞等)识别靶细胞上结合的抗体,然后引起靶细胞裂解。介导ADCC的此类细胞毒性细胞通常表达Fc受体(FcR)。介导ADCC的原代细胞(NK细胞)表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII和/或Fc γ RIV。造血细胞上的FcR表达概述于Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92(1991)中。为了估计分子的ADCC活性,可进行体外ADCC测定,例如美国专利5,500,362或5,821,337中描述的测定。用于此类测定的有用的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。备选地或另外地,可以例如在动物模型例如Clynes等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 95:652-656(1998)中公开的动物模型中体内评估目的分子的ADCC活性。

[0101] 术语“Fc受体”或“FcR”用于描述结合抗体的Fc区域的受体,其中Fc区域包含重链的铰链区和C μ 2及C μ 3结构域。例如FcR可以是天然序列人FcR。FcR可以是结合IgG抗体的FcR(γ 受体),包括Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII和Fc γ RIV亚类的受体,包括此类受体的等位基因变体和选择性剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“活化受体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”),其两者具有主要不同在于其细胞质结构域的相似的氨基酸序列。活化受体Fc γ RIIA在其细胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体Fc γ RIIB在其细胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见, Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234(1997))。FcR综述于Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92(1991); Capel等人, *Immunomethods*, 4:25-34(1994); 和 de Haas等人, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41(1995)中。其他FcR,包括将来鉴定的FcR,由本文中的术语“FcR”包括。该术语还包括新生儿受体FcRn,其负责将母源IgG转移至胎儿(Guyer等人, *Immunol.*, 117:587(1976)和Kim等人, *J. Immunol.*, 24:249(1994))。免疫球蛋白Fc片段上的主要FcR结合部位存在于C μ 1与C μ 2结构域之间的铰链区中。该铰链区与各种白细胞上的FcR1-3相互作用并且触发此类细胞攻击靶(Wines等人, *J. Immunol.*, 164:5313-5318(2000))。铰链区包括,但不限于,美国专利6,165,476中描述的序列。

[0102] 术语“能够诱导抗体依赖性细胞毒性”是指试剂例如抗体展现ADCC的能力,如通过本领域技术人员已知的测定法测量的。这样的活性通常特征在于Fc区域与不同FcR的结合。不受任何特定机制的限制,本领域技术人员将认识到,抗体显示ADCC的能力可以例如,通过其亚类(例如IgG1或IgG3),通过导入Fc区域的突变或通过对抗体的Fc区域中的糖模式的修饰来获得。此类修饰描述于例如美国专利申请案2007-0092521中。

[0103] 术语“人抗体衍生物”是指人抗体的任何修饰形式,例如,抗体与另一种试剂或抗体的缀合物。

[0104] 术语“人源化的抗体”意指其中已将来源于另一个哺乳动物物种例如小鼠的种系的CDR序列移植至人构架序列上的抗体。可在人构架序列中进行另外的构架区修饰。

[0105] 术语“嵌合抗体”意指其中可变区序列来源于一个物种并且恒定区序列来源于另一个物种的抗体,例如其中可变区序列来源于小鼠抗体并且恒定区序列来源于人抗体的抗体。

[0106] 短语“特异性结合”,如本文中所使用的,意指识别并且结合特定分子但基本上不识别或结合相同样品中的其他分子的化合物,例如,蛋白质、核酸、抗体等。例如,抗体或肽抑制剂(例如,与相关抗原 α 5 β 1结合的抗 α 5 β 1抗体)识别和结合样品中的相关配体

但基本上不识别或结合样品中的其他分子。因此,在指定的测定条件下,指定的结合部分(例如抗体或其抗原结合部分)优先结合特定靶分子例如 $\alpha 5 \beta 1$,并且不以显著的量结合存在于测试样品中的其他成分。可使用许多种测定形式来选择特异性结合目的分子的抗体。例如,固相 ELISA 免疫测定、免疫沉淀、BIAcore、FACS 和 Western 印迹分析是可用于鉴定与 $\alpha 5 \beta 1$ 特异性反应的抗体的测定。通常,特异性或选择性反应为背景信号或噪声的至少 2 倍,并且更常见地是背景的 10 倍以上,甚至更特别地,当平衡解离常数 (K_D) $\leq 1 \mu M$,例如 $\leq 100 nM$ 和另外地例如 $\leq 10 nM$ 时,抗体被认为“特异性”结合抗原。

[0107] 如本文中所使用的,“特异性结合人整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ ”的抗体意指以 $1 \times 10^{-7} M$ 或更小, $5 \times 10^{-8} M$ 或更小, $3 \times 10^{-8} M$ 或更小, $1 \times 10^{-8} M$ 或更小或 $5 \times 10^{-9} M$ 或更小的 K_D 结合人整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 的抗体。

[0108] 术语“ k_{on} ”,如本文中所使用的,意指特定抗体-抗原相互作用的结合速率(on-rate)或缔合速率(association rate),而术语“ k_{off} ”,如本文中所使用的,意指特定抗体-抗原相互作用的解离速率(off-rate)或分解速率。术语“ K_D ”,如本文中所使用的,意指解离常数,其获自 k_{off} 对 k_{on} 的比(即 k_{off}/k_{on})并且以摩尔浓度(M)表示。可使用本领域内良好建立的方法测定抗体的 K_D 值。用于测定抗体的 K_D 的一个方法是使用表面等离子共振术,通常使用生物传感器系统例如 **Biacore®** 系统。

[0109] 如本文中所使用的,术语 IgG 抗体的“高亲和力”是指对于靶抗原具有 $1 \times 10^{-7} M$ 或更小, $5 \times 10^{-8} M$ 或更小,或 $5 \times 10^{-9} M$ 或更小的 K_D 的抗体。然而,对于其他抗体同种型,“高亲力”结合可变化。例如, IgM 同种型的“高亲和力”结合是指具有 $10^{-6} M$ 或更小, $10^{-7} M$ 或更小,或 $10^{-8} M$ 或更小的 K_D 的抗体。

[0110] 如本文中所使用的,关于抗体的术语“竞争”,是指第一抗体或其抗原结合部分与第二抗体或其抗原结合部分竞争结合,其中与在第二抗体不存在的情况下第一抗体的结合相比较,第一抗体与其关联表位的结合在第二抗体存在的情况下发生可检测的减少。其中第二抗体对其表位的结合在第一抗体存在的情况下也可检测地减少的备选情况可以存在但不是必须存在。即,第一抗体可抑制第二抗体对其表位的结合,而该第二抗体没有抑制第一抗体对其各自表位的结合。然而,在各抗体可检测地抑制其他抗体与其关联表位或配体的结合的情况下,不论达到相同、更大或更小的程度,抗体都被认为彼此之间“交叉竞争”对它们各自表位的结合。例如,交叉竞争抗体可结合本文中公开的抗体所结合的表位或表位的部分。竞争和交叉竞争抗体的用途包括在本公开内容中。无论此类竞争或交叉竞争籍以发生的机制是什么(例如,位阻、构象变化或对共同表位或其部分的结合等),本领域技术人员基于本文中提供的教导将理解,这样的竞争和/或交叉竞争抗体包括在并且可用于本文中公开的方法中。

[0111] 术语“表位”包括能够特异性结合免疫球蛋白或 T 细胞受体的任何蛋白质决定簇。表位决定簇(Epitopic determinant)通常由分子的化学上活跃的表面基团例如氨基酸或糖侧链组成并且通常具有特定的三维结构特征,以及特定的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于对前者(而非后者)的结合在变性溶剂存在的情况下丧失。

[0112] “糖形”是指包含多种糖单位的连接的复杂低聚糖结构。此类结构描述于例如, Essentials of Glycobiology Varki 等人, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1999) (其还提供了标准糖生物学命名法的综述)中。此类糖形

包括但不限于 G2、G1、G0、G-1 和 G-2 (参见,例如,国际专利公开案 WO 99/22764)。

[0113] “糖基化模式”定义为共价连接至蛋白质的糖单位(例如,糖形)的模式以及糖形共价连接至蛋白质(更特别地免疫球蛋白)的肽主链的位点的模式。

[0114] 由不同细胞系或在转基因动物中表达的抗体彼此相比,可能将具有不同的糖形和/或糖基化模式。然而,无论此类抗体的糖基化如何,由本文中提供的核酸分子编码的或包含本文中提供的氨基酸序列的所有抗体是本公开内容的一部分。

[0115] 如本文中所使用的,术语“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0116] 如本文中所使用的,“治疗”是指减少患者经历疾病症状(即,肿瘤生长和/或转移,或由免疫细胞的数量和/或活性等介导的其他效应)的频率。该术语包括施用本公开内容的化合物或试剂以预防或延迟疾病的症状、并发症或生物化学指标(indicia)的发作,减轻疾病、病状或病症的症状或阻止或抑制疾病、病状或病症的进一步发展。治疗可以是预防性的(以预防或延迟疾病的发作或预防其临床或亚临床症状的表现)或治疗性抑制或减轻疾病表现后的病状。

[0117] 在下列小部分更详细地描述本公开内容的各个方面。

[0118] 抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体

[0119] 本公开内容的抗体的特征在于抗体的特定功能特征或性质。例如,抗体特异性结合人 $\alpha 5 \beta 1$ 。优选,本公开内容的抗体以高亲和力例如以 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更小的 K_D 结合 $\alpha 5 \beta 1$ 。

[0120] 优选,抗体以 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更小, $2 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更小, $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小, $4 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小, $3 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小或 $2.7 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小的 K_D 结合人 $\alpha 5 \beta 1$ 。估计抗体对 $\alpha 5 \beta 1$ 的结合能力的测定在本领域内是已知的,包括例如,ELISA、Western 印迹法、RIA 和流式细胞术分析。合适的测定法详细地描述于实施例。抗体的结合动力学(例如,结合亲和力)还可通过本领域内已知的测定法例如通过 Biacore 分析来估计。

[0121] 本公开内容的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体还能够诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。例如,可以通过使用特定亚类(例如 IgG1、IgG2、IgG3)(包括可进一步增强抗体的 ADCC 活性水平的对 Fc 结构域的突变)来获得这样的功能性。此类突变和测量 ADCC 的方法进一步描述于实施例中。

[0122] 单克隆抗体 22B5

[0123] 本公开内容的一个举例说明性抗体是人单克隆抗体 22B5,如实施例 1 和 2 中所描述的。22B5 的 V_H 氨基酸序列示于图 1B 中以及示于 SEQ ID NO:7 中。22B5 的 V_L 氨基酸序列示于图 1D 中以及示于 SEQ ID NO:8 中。如图 1B 和图 2 中所示,22B5 的重链可变区包含回复至人种系基因序列的两个突变。即,22B5 包含一个在氨基酸残基编号 30 上从异亮氨酸至丝氨酸的突变(I30S)和在氨基酸残基编号 33 上从天冬酰胺至丝氨酸的突变(N33S)。如本文中所使用的,“22B5”是指其中已产生所述 I30S 和 N33S 重链可变区种系突变的抗体。

[0124] 鉴于 22B5 可结合 $\alpha 5 \beta 1$,可将 V_H 和 V_L 序列与其他抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体“混合和匹配”以产生本公开内容的另外的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 结合分子。可使用上述和实施例中的结合测定法(例如,ELISA)检测此类“混合和匹配的”抗体的 $\alpha 5 \beta 1$ 结合。在一种情况下,当将 V_H 和 V_L 链混合和匹配时,用结构上相似的 V_H 序列置换来自特定 V_H/V_L 配对的 V_H 序列。同样地,在另一

个情况下,用结构上相似的 V_L 序列置换来自特定的 V_H/V_L 配对的 V_L 序列。

[0125] 在另一个方面,本公开内容提供了包含 22B5 的重链和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的抗体。22B5 的 V_H CDR1 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO :1。22B5 的 V_H CDR2 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO :2。22B5 的 V_H CDR3 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO :3。22B5 的 V_L CDR1 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO :4。22B5 的 V_L CDR2 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO :5。22B5 的 V_L CDR3 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO :6。使用 Kabat 系统 (Kabat, E. A., 等人 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) 描绘 CDR 区。

[0126] 鉴于 22B5 结合 $\alpha 5 \beta 1$ 以及该抗原-结合特异性主要由 CDR1、CDR2 和 CDR3 区域提供,因此可将 V_H CDR1、CDR2 和 CDR3 序列和 V_L CDR1、CDR2 和 CDR3 序列“混合和匹配”(即,可将来自不同 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的 CDR 混合和匹配,虽然各抗体通常将包含 V_H CDR1、CDR2 和 CDR3 以及 V_L CDR1、CDR2 和 CDR3) 以产生本公开内容的另外的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 结合分子。可使用上述和实施例中的结合测定法(例如,ELISA、Biacore 分析)来检测此类“混合和匹配的”抗体的 $\alpha 5 \beta 1$ 结合。在一种情况下,当将 V_H CDR 序列混合和匹配时,用结构上相似的 CDR 序列置换来自特定 V_H 序列的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 序列。同样,当将 V_L CDR 序列混合和匹配时,通常用结构上相似的 CDR 序列置换来自特定 V_L 序列的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 序列。对于本领域技术人员来说显而易见的是,可通过用结构上相似的序列(其来自本文中公开的 CDR 序列)置换一个或多个 V_H 和 / 或 V_L CDR 区序列来产生新型 V_H 和 V_L 序列。

[0127] 因此,在另一个方面,本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含:(a) 含有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的重链可变区 CDR1;(b) 含有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的重链可变区 CDR2;(c) 含有 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列的重链可变区 CDR3;(d) 含有 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR1;(e) 含有 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR2;和 / 或 (f) 含有 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR3;其中抗体特异性结合 $\alpha 5 \beta 1$, 优选人 $\alpha 5 \beta 1$ 。

[0128] 单克隆抗体 2D2、24C7 和 1D9

[0129] 本公开内容的另一个举例说明性抗体是实施例 1 和 8 中描述的人单克隆抗体 2D2。2D2 的 V_H 氨基酸序列示于 SEQ ID NO :39 中。2D2 的 V_L 氨基酸序列示于 SEQ ID NO :40 中。

[0130] 本公开内容的另一个举例说明性抗体是实施例 1 和 8 中描述的人单克隆抗体 24C7。24C7 的 V_H 氨基酸序列示于 SEQ ID NO :19 中。24C7 的 V_L 氨基酸序列示于 SEQ ID NO :20 中。

[0131] 本公开内容的另一个举例说明性抗体是实施例 1 和 8 中描述的人单克隆抗体 1D9。1D9 的 V_H 氨基酸序列示于 SEQ ID NO :29 中。1D9 的 V_L 氨基酸序列示于 SEQ ID NO :30 中。

[0132] 鉴于 2D2、24C7 和 1D9 可结合 $\alpha 5 \beta 1$, 因此可将此类抗体的 V_H 和 V_L 序列与其他抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体“混合和匹配”以产生本公开内容的另外的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 结合分子。可使用上文和实施例中描述的结合测定法(例如,ELISA)检测此类“混合和匹配的”抗体的 $\alpha 5 \beta 1$ 结合。在一种情况下,当将 V_H 和 V_L 链混合和匹配时,用结构上相似的 V_H 序列置换来自特定 V_H/V_L 配对的 V_H 序列。同样地,在另一个情况下,用结构上相似的 V_L 序列置换来自特定的 V_H/V_L 配对的 V_L 序列。

[0133] 在另一个方面,本公开内容提供了包含 2D2、24C7 和 1D9 的重链和轻链 CDR1、CDR2

和 CDR3 的抗体。这些 CDR 的相应的氨基酸序列示于下面。

[0134]

抗体	CDR	SEQ ID NO :		抗体	CDR	SEQ ID NO :
2D2	V _H CDR1	33		24C7	V _L CDR1	16
2D2	V _H CDR2	34		24C7	V _L CDR2	17
2D2	V _H CDR3	35		24C7	V _L CDR3	18
2D2	V _L CDR1	36		1D9	V _H CDR1	23
2D2	V _L CDR2	37		1D9	V _H CDR2	24
2D2	V _L CDR3	38		1D9	V _H CDR3	25
24C7	V _H CDR1	13		1D9	V _L CDR1	26
24C7	V _H CDR2	14		1D9	V _L CDR2	27
24C7	V _H CDR3	15		1D9	V _L CDR3	28

[0135] 使用 Kabat 系统 (Kabat, E. A., 等人 . (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) 描绘 CDR 区。

[0136] 鉴于 2D2、24C7 和 1D9 结合 $\alpha 5 \beta 1$ 以及抗原 - 结合特异性主要由 CDR1、CDR2 和 CDR3 区域提供, 因此可将 V_HCDR1、CDR2 和 CDR3 序列和 V_L CDR1、CDR2 和 CDR3 序列“混合和匹配”(即, 可将来自不同 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的 CDR 混合和匹配, 虽然各抗体通常将包含 V_H CDR1、CDR2 和 CDR3 以及 V_L CDR1、CDR2 和 CDR3) 以产生本公开内容的另外的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 结合分子。可使用上文和实施例中描述的结合测定法(例如, ELISA、Biacore 分析)来检测此类“混合和匹配的”抗体的 $\alpha 5 \beta 1$ 结合。在一种情况下, 当将 V_H CDR 序列混合和匹配时, 用结构上相似的 CDR 序列置换来自特定 V_H 序列的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 序列。同样, 当将 V_L CDR 序列混合和匹配时, 通常用结构上相似的 CDR 序列置换来自特定 V_L 序列的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 序列。对于本领域技术人员来说将显而易见的是, 可通过用来自本文中公开的 CDR 序列的结构上相似的序列置换一个或多个 V_H 和 / 或 V_L CDR 区序列来产生新型 V_H 和 V_L 序列。

[0137] 因此, 在另一个方面, 本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含: (a) 含有 SEQ ID NO: 33 的氨基酸序列的重链可变区 CDR1; (b) 含有 SEQ ID NO: 34 的氨基酸序列的重链可变区 CDR2; (c) 含有 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列的重链可变区 CDR3; (d) 含有 SEQ ID NO: 36 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR1; (e) 含有 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR2; 和 / 或 (f) 含有 SEQ ID NO: 38 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR3; 其中抗体特异性结合 $\alpha 5 \beta 1$, 优选人 $\alpha 5 \beta 1$ 。

[0138] 在另一个方面, 本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含: (a) 含有 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列的重链可变区 CDR1; (b) 含有 SEQ ID NO: 14 的氨基

酸序列的重链可变区 CDR2 ;(c) 含有 SEQ ID NO :15 的氨基酸序列的重链可变区 CDR3 ;(d) 含有 SEQ ID NO :16 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR1 ;(e) 含有 SEQ ID NO :17 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR2 ;和 / 或 (f) 含有 SEQ ID NO :18 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR3 ;其中抗体特异性结合 $\alpha 5 \beta 1$, 优选人 $\alpha 5 \beta 1$ 。

[0139] 在另一个方面, 本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含 : (a) 含有 SEQ ID NO :23 的氨基酸序列的重链可变区 CDR1 ;(b) 含有 SEQ ID NO :24 的氨基酸序列的重链可变区 CDR2 ;(c) 含有 SEQ ID NO :25 的氨基酸序列的重链可变区 CDR3 ;(d) 含有 SEQ ID NO :26 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR1 ;(e) 含有 SEQ ID NO :27 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR2 ;和 / 或 (f) 含有 SEQ ID NO :28 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR3 ;其中抗体特异性结合 $\alpha 5 \beta 1$, 优选人 $\alpha 5 \beta 1$ 。

[0140] 具有特定种系序列的抗体

[0141] 在某些方面, 本公开内容的抗体包含来自特定种系重链免疫球蛋白基因的重链可变区和 / 或来自特定种系轻链免疫球蛋白基因的轻链可变区。

[0142] 例如, 在一个方面, 本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含作为人 V_H 4-39 基因的产物或源自人 V_H 4-39 基因的重链可变区, 其中抗体特异性结合 $\alpha 5 \beta 1$ 。在另一个方面, 本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含作为人 V_H 3-30.3 基因的产物或源自人 V_H 3-30.3 基因的重链可变区, 其中抗体特异性结合 $\alpha 5 \beta 1$ 。在另一个方面, 本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含作为人 V_K L6 基因的产物或源自人 V_K L6 基因的轻链可变区, 其中抗体特异性结合 $\alpha 5 \beta 1$ 。在另一个示例性方面, 本公开内容提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其中抗体 :

[0143] (a) 包含作为人 V_H 4-39 基因 (该基因编码示于 SEQ ID NO :7 中的氨基酸序列) 或人 3-30.3 基因 (该基因编码示于 SEQ ID NO :19、29 或 39 的氨基酸序列) 的产物或源自其的重链可变区 ;

[0144] (b) 包含作为人 V_K L6 基因 (该基因编码示于 SEQ ID NO :8、20、30 或 40 的氨基酸序列) 的产物或源自其的轻链可变区 ;和

[0145] (c) 特异性结合 $\alpha 5 \beta 1$, 优选人 $\alpha 5 \beta 1$ 。

[0146] 具有分别地 V_H 4-39 和 V_K L6 的 V_H 和 V_L 的抗体的实例是 22B5。具有分别地 V_H 3-30.3 和 V_K L6 的 V_H 和 V_L 的抗体的实例是 24C7、2D2 和 1D9。

[0147] 如本文中所使用的, 人抗体包含重链或轻链可变区, 所述可变区是特定种系序列的产物或“源自”特定种系序列 (如果抗体的可变区获自使用人种系免疫球蛋白基因的系统)。此类系统包括用目的抗原免疫携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠或用目的抗原筛选在噬菌体上展示的人免疫球蛋白基因文库。这样可通过将人抗体的氨基酸序列与人种系免疫球蛋白的氨基酸序列相比较, 然后选择在序列上与人抗体的序列最接近 (即, 最大百分比同一性) 的人种系免疫球蛋白序列来鉴定作为人种系免疫球蛋白序列的“产物”或“源自”其的人抗体。与种系序列相比, 作为特定人种系免疫球蛋白序列的“产物”或“源自”其的人抗体可包含由于例如, 天然发生的体细胞突变或有意导入的定点突变而产生的氨基酸差异。然而, 选择的人抗体通常在氨基酸序列上与由人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列至少 90% 同一并且包含将人抗体鉴定为人的抗体的氨基酸残基 (当与其他物种的种系免疫球蛋白氨基酸序列 (例如, 鼠种系序列) 相比较时)。在某些情况下, 人抗体可以在氨

氨基酸序列上与由种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列至少 95% 或甚至至少 96%、97%、98% 或 99% 同一。在某些情况下,人抗体在氨基酸序列上与由种系 Ig 基因编码的氨基酸序列同一。通常,来源于特定人种系序列的人抗体将展示不超过 10 个氨基酸的差异(与人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列相比)。在某些情况下,与种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列相比,人抗体可展示的不超过 5 个或甚至不超过 4、3、2 或 1 个氨基酸的差异。

[0148] 同源抗体

[0149] 在另一个方面,本公开内容的抗体包含重链和轻链可变区,所述可变区包含与本文中描述的举例说明性抗体的氨基酸序列同源的氨基酸序列,并且其中抗体保持本公开内容的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的期望的功能性质。

[0150] 例如,本公开内容提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:

[0151] (a) 重链可变区包含与选自 SEQ ID NO:7、19、29 和 39 的氨基酸序列至少 80% 同源的氨基酸序列;

[0152] (b) 轻链可变区包含与选自 SEQ ID NO:8、20、30 和 40 的氨基酸序列至少 80% 同源的氨基酸序列;并且抗体展示一个或多个下列性质:

[0153] (i) 抗体以 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更小的 K_D 结合人 $\alpha 5 \beta 1$;

[0154] (ii) 抗体能够诱导抗体依赖性细胞毒性。

[0155] 在不同的实例中,抗体可以是例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

[0156] 在其他实例中, V_H 和 / 或 V_L 氨基酸序列可以与上文中所示的序列 85%,90%,95%,96%,97%,98% 或 99% 同源。可通过诱变(例如,定点诱变或 PCR 介导的诱变)编码 SEQ ID NO:7、19、29、39、8、20、30 和 / 或 40 的核酸分子,然后使用本文中描述的功能测定法就保留的功能(即,上述(i)和/或(ii)中所示的性质)测试所编码的改变的抗体来获得具有 V_H 和 V_L 区(其与上文中所示的序列的 V_H 和 V_L 区具有高度(即,80%或更大)的同源性)的抗体。

[0157] 如本文中所使用的,两个氨基酸序列之间的百分比同源性等于两个序列之间的百分比同一性。两个序列之间的百分比同一性是在考虑为了两个序列的最佳比对而需要导入的缺口的数目和各缺口的长度的情况下,由序列共有的相同位点的数目的函数(即, %同源性 = 相同位点的 # / 位点的总 # $\times 100$)。可使用下文非限定性实例中描述的数学算法来进行两个序列之间的序列比较和百分比同一性的测定。

[0158] 可使用已整合入 ALIGN 程序(版本 2.0)的 E. Meyers 和 W. Miller 的算法(Comput Appl. Biosci., 4:11-17(1988)),使用 PAM 120 权重残基表(weight residue table)、12 的缺口长度罚分和 4 的缺口罚分来测定两个氨基酸序列之间的百分比同一性。此外,可使用已整合入 GCG 软件包(可在 <http://www.gcg.com> 上获得)的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch(J. Mol. Biol. 48:444-453(1970)) 算法,使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵,以及 16、14、12、10、8、6 或 4 的缺口权重(gap weight)和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重(length weight)来测定两个氨基酸序列之间的百分比同一性。

[0159] 另外地或备选地,本公开内容的蛋白质序列还可用作“查询序列”以针对公共数据库进行检索,从而例如,鉴定相关序列。可使用 Altschul, 等人(1990)J. Mol. Biol. 215:403-10 的 XBLAST 程序(版本 2.0)来进行此类检索。可使用 XBLAST 程序,评分 = 50,字长

= 3 来进行 BLAST 蛋白质检索以获得与本公开内容的抗体分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的带缺口的比对 (gapped alignment), 可如 Altschul 等人, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402 中所述使用 Gapped BLAST。当使用 BLAST 和 Gapped BLAST 程序时, 可使用各自程序 (例如, XBLAST 和 NBLAST) 的缺省参数。参见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

[0160] 具有保守修饰的抗体

[0161] 在某些情况下, 本公开内容的抗体包含含有 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的重链可变区和含有 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的轻链可变区, 其中这些 CDR 序列中的一个或多个包含基于本文中所述的举例说明性抗体 (例如, 22B5、1D9、24C7 和 2D2) 的特定的氨基酸序列或其保守修饰形式, 并且其中抗体保留本公开内容的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的一个或多个期望的功能性质。因此, 本公开内容提供了包含含有 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的重链可变区和含有 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的轻链可变区的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其中:

[0162] (a) 重链可变区 CDR3 序列包含选自 SEQ ID NO:3、15、25 和 35 以及其保守修饰形式的氨基酸序列;

[0163] (b) 轻链可变区 CDR3 序列包含选自 SEQ ID NO:6、18、28 和 38 以及其保守修饰形式的氨基酸序列; 并且抗体展示一个或多个下列性质:

[0164] (i) 抗体以 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更小的 K_D 结合人 $\alpha 5 \beta 1$;

[0165] (ii) 抗体能够诱导抗体依赖性细胞毒性。

[0166] 在其他情况下, 重链可变区 CDR2 序列包含选自 SEQ ID NO:2、14、24 和 34 以及其保守修饰形式的氨基酸序列; 并且轻链可变区 CDR2 序列包含选自 SEQ ID NO:5、17、27 和 37 以及其保守修饰形式的氨基酸序列。在另一个情况下, 重链可变区 CDR1 序列包含选自 SEQ ID NO:1、13、23 和 33 以及其保守修饰形式的氨基酸序列; 并且轻链可变区 CDR1 序列包含选自 SEQ ID NO:4、16、26 和 36 以及其保守修饰形式的氨基酸序列。

[0167] 如本文中所使用的, 术语“保守修饰”意指氨基酸修饰, 其不显著影响或改变包含所述氨基酸序列的抗体的结合特征。此类保守修饰包括氨基酸置换、添加和缺失。可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变和 PCR 介导的诱变将修饰导入本公开内容的抗体。给定序列的保守修饰形式可包括与该序列至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 同一的序列。保守氨基酸置换是其中用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的置换。在本领域内已定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链 (例如, 赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链 (例如, 天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链 (例如, 甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链 (例如, 丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β -分支的侧链 (例如, 苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸) 和芳香侧链 (例如, 酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸) 的氨基酸。因此, 本公开内容的抗体的 CDR 区域中的一个或多个氨基酸残基可来自相同侧链家族的其他氨基酸残基置换, 并且可使用本文中描述的功能测定法就保留的功能 (即, 上述 (i) 至 (ii) 中所示的性质) 测试改变的抗体。另一种类型的氨基酸修饰是消除形成潜在的脱酰胺位点的天冬酰胺-甘氨酸对 (通过改变一个或两个所述残基)。在另一个实例中, 本公开内容的 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的重链的 C 末端赖氨酸已被切除, 从而不存在。C 末端赖氨酸切除可预先通过工程改造来进行或可由用于表达和纯化

抗体的条件引起。在多种情况下， $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的重链和轻链可任选地包含信号序列。

[0168] 结合与本公开内容的举例说明性抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体相同的表位的抗体

[0169] 在另一个方面，本公开内容提供了结合与本公开内容的任何举例说明性 $\alpha 5 \beta 1$ 单克隆抗体相同的人 $\alpha 5 \beta 1$ 上的表位的抗体（即，具有与本公开内容的任何单克隆抗体交叉竞争对 $\alpha 5 \beta 1$ 的结合的能力的抗体）。例如，用于交叉竞争研究的参照抗体可以是单克隆抗体 22B5（具有分别在 SEQ ID NO :7 和 8 中显示的 V_H 和 V_L 序列）或单克隆抗体 24C7（具有分别示于 SEQ ID NO :19 和 20 中的 V_H 和 V_L 序列）或单克隆抗体 1D9（具有分别示于 SEQ ID NO :29 和 30 中的 V_H 和 V_L 序列）或单克隆抗体 2D2（具有分别示于 SEQ ID NO :39 和 40 中的 V_H 和 V_L 序列）。可基于它们在标准 $\alpha 5 \beta 1$ 结合测定中与 22B5、24C7、1D9 或 2D2 交叉竞争的能力鉴定此类交叉竞争性抗体。例如，可使用 BIAcore 分析、ELISA 测定或流式细胞术来证明与本公开内容的举例说明性抗体的交叉竞争。测试抗体抑制例如，22B5、24C7、1D9 或 2D2 对人 $\alpha 5 \beta 1$ 的结合的能力证明测试抗体可与 22B5、24C7、1D9 或 2D2 竞争对人 $\alpha 5 \beta 1$ 的结合，从而结合与 22B5、24C7、1D9 或 2D2 相同的人 $\alpha 5 \beta 1$ 上的表位。在一个情况下，结合与 22B5、24C7、1D9 或 2D2 相同的人 $\alpha 5 \beta 1$ 上的表位的抗体是人单克隆抗体。可如例如实施例所述，制备和分离这样的人单克隆抗体。

[0170] 工程改造的和修饰的抗体

[0171] 还可使用具有本文中公开的一个或多个 V_H 和 / 或 V_L 序列的抗体作为起始材料来工程改造修饰的抗体以制备本公开内容的抗体或其抗原结合部分，所述修饰的抗体与起始抗体相比可具有改变的性质。可通过修饰一个或两个可变区（即， V_H 和 / 或 V_L ）内，例如一个或多个 CDR 区内和 / 或一个或多个构架区内的一个或多个残基来工程改造抗体。此外或备选地，可通过修饰恒定区内的残基来工程改造抗体，例如以改变抗体的效应子功能。

[0172] 可进行的一种类型的可变区工程改造是 CDR 移植。抗体主要通过位于 6 个重链和轻链互补决定区（CDR）中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。因此，CDR 中的氨基酸序列在个体抗体之间比 CDR 外的序列更多样。因为 CDR 序列负责大部分抗体 - 抗原相互作用，因此可能通过构建表达载体来表达模拟特定的天然发生的抗体的性质的重组抗体，所述表达载体包含被移植至来自不同抗体（其具有不同性质）的构架序列上的来自特定的天然发生的抗体的 CDR 序列（参见，例如，Riechmann, L. 等人 (1998) Nature 332 :323-327 ; Jones, P. 等人 (1986) Nature 321 :522-525 ; Queen, C. 等人 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A. 86 :10029-10033 ; 属于 Winter 的美国专利 5, 225, 539 和属于 Queen 等人的美国专利 5, 530, 101 ; 5, 585, 089 ; 5, 693, 762 和 6, 180, 370）。

[0173] 因此，本公开内容的另一个方面涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含含有分别选自 SEQ ID NO :1, 13, 23 和 33、SEQ ID NO :2, 14, 24 和 34 以及 SEQ ID NO :3, 15, 25 和 35 的氨基酸序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列，所述轻链可变区包含含有分别选自 SEQ ID NO :4, 16, 26 和 36、SEQ ID NO :5, 17, 27 和 37 以及 SEQ ID NO :6, 18, 28 和 38 的氨基酸序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。因此，此类抗体包含单克隆抗体 22B5、24C7、1D9 和 2D2 的 V_H 和 V_L CDR 序列，还可包含与这些抗体不同的构架序列。

[0174] 此类构架序列可获自包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库或出版的参考资料。例如，人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可见于“VBase”人种系序列数据

库（可在互联网上在 www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase 获得），以及见于 Kabat, E. A., 等人 (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., 等人 (1992), J. Mol. Biol. 227: 776-798; 和 Cox, J. P. L 等人 (1994), Eur. J. Immunol. 24: 827-836 中; 其各自的内容明确地通过引用合并入本文)。作为另一个实例, 人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可见于 Genbank 数据库。例如, 在 HCo7 HuMAb 小鼠中发现的下列重链种系序列可在所附 Genbank 登录号中获得: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 和 BC070333), 3-33 (NG_0010109 和 NT_024637) 以及 3-7 (NG_0010109 和 NT_024637)。作为另一个实例, 在 HCo12 HuMAb 小鼠中发现的下列重链种系序列可在所附 Genbank 登录号中获得: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 和 BC070333)、5-51 (NG_0010109 和 NT_024637)、4-34 (NG_0010109 和 NT_024637)、3-30.3 (X92283) 和 3-23 (AJ406678)。

[0175] 用于本公开内容的抗体的构架序列包括但不限于在结构上与本公开内容的选择的抗体使用的构架序列相似, 例如与本公开内容的举例说明性单克隆抗体使用的 V_H 4-39 和 / 或 V_H 3-30.3 构架序列和 / 或 V_L 6 构架序列相似的构架序列。例如, 可将 V_H CDR1、CDR2 和 CDR3 序列和 V_L CDR1、CDR2 和 CDR3 序列移植至具有与在构架序列所源自的种系免疫球蛋白基因中发现的序列相同的序列的构架区, 或可将 CDR 序列移植至与种系序列相比较包含一个或多个突变的构架区。例如, 已发现在某些情况下, 突变构架区内的残基以保持或增强抗体的抗原结合能力是有益的（参见例如, 属于 Queen 等人的美国专利 5, 530, 101; 5, 585, 089; 5, 693, 762 和 6, 180, 370）。

[0176] 另一种类型的可变区修饰是突变 V_H 和 / 或 V_L CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 区内的氨基酸残基, 从而提高目的抗体的一个或多个结合性质（例如, 亲和力）。可进行定点诱变或 PCR 介导的诱变以导入突变, 并且可在本文中描述的和实施例中提供的体外或体内测定中估计对抗体结合或其他目的功能性质的影响。通常, 导入保守置换（如上论述的）。突变可以是氨基酸置换、添加或缺失。此外, CDR 区中通常不超过 1、2、3、4 或 5 个残基被改变。

[0177] 因此, 在另一个实施方案中, 本公开内容提供了包含重链可变区的分离的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 单克隆抗体或其抗原结合部分, 所述重链可变区包含: (a) 含有选自 SEQ ID NO: 1、13、23 和 33 以及与 SEQ ID NO: 1、13、23 或 33 相比具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸置换、缺失或添加的氨基酸序列的氨基酸序列的 V_H CDR1 区; (b) 含有选自 SEQ ID NO: 2、14、24 和 34 以及与 SEQ ID NO: 2、14、24 或 34 相比具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸置换、缺失或添加的氨基酸序列的氨基酸序列的 V_H CDR2 区; (c) 含有选自 SEQ ID NO: 3、15、25 和 35 以及与 SEQ ID NO: 3、15、25 或 35 相比具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸置换、缺失或添加的氨基酸序列的氨基酸序列的 V_H CDR3 区; (d) 含有选自 SEQ ID NO: 4、16、26 和 36 以及与 SEQ ID NO: 4、16、26 或 36 相比具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸置换、缺失或添加的氨基酸序列的氨基酸序列的 V_L CDR1 区; (e) 含有选自 SEQ ID NO: 5、17、27 和 37 以及与 SEQ ID NO: 5、17、27 或 37 相比具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸置换、缺失或添加的氨基酸序列的氨基酸序列的 V_L CDR2 区; 和 (f) 含有选自 SEQ ID NO: 6、18、28 和 38 以及与 SEQ ID NO: 6、18、28 或 38 相比具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸置换、缺失或添加的氨基酸序列的氨基酸序列的 V_L CDR3 区。

[0178] 本公开内容的工程改造的抗体包括其中已对 V_H 和 / 或 V_L 中的构架残基进行修饰例如以提高抗体的性质的抗体。通常产生此类构架修饰以减少抗体的免疫原性。例如, 一个

方法是 将一个或多个构架残基“回复突变”至相应的种系序列。更特别地,已经历体细胞突变的抗体可包含与抗体所源自的种系序列不同的构架残基。此类残基可通过将抗体的构架序列与抗体所源自的种系序列相比较来鉴定。为了使构架区序列返回至它们的种系构型,可通过例如定点诱变或 PCR 介导的诱变将体细胞突变“回复突变”至种系序列。

[0179] 另一种类型的构架修饰包括突变构架区内或甚至一个或多个 CDR 区内的一个或多个残基,以除去 T 细胞表位,从而减少抗体的潜在的免疫原性。该方法也称为“去免疫(deimmunization)”并且更详细地描述于 Carr 等人的美国专利公开案 20030153043。

[0180] 除了构架区或 CDR 区内产生的修饰外或作为所述修饰的另外选择,可对本公开内容的抗体进行工程改造以在 Fc 区域内包含修饰,通常以改变抗体的一个或多个功能性质例如血清半衰期、补体结合、Fc 受体结合和 / 或抗原依赖性细胞的细胞毒性。此外,可对本公开内容的抗体进行化学修饰(例如,可将一个或多个化学部分连接至抗体)或进行修饰以改变其糖基化,从而改变抗体的一个或多个功能性质。下面更详细地描述此类方面的每一个方面。Fc 区域中的残基编号是 EUindex 或 Kabat 的编号。

[0181] 在一种情况下,修饰 CH1 的铰链区以便改变例如增加或减少铰链区中半胱氨酸残基的数目。该方法进一步描述于属于 Bodmer 等人的美国专利 5,677,425。改变 CH1 的铰链区中的半胱氨酸残基的数目以例如促进轻链和重链的装配或增加或减少抗体的稳定性。

[0182] 在另一个情况下,突变抗体的 Fc 铰链区以减少抗体的生物学半衰期。更特别地,将一个或多个氨基酸突变导入 Fc-铰链片段的 CH2-CH3 结构域交界区域以便抗体具有削弱的葡萄球菌蛋白 A (SpA) 结合(相对于天然 Fc-铰链结构域 SpA 结合)。该方法更详细地描述于属于 Ward 等人的美国专利 6,165,745 中。

[0183] 在另一种情况下,修饰抗体以增加其生物学半衰期。不同的方法是可能的。例如,可导入下列突变中的一个或多个:T252L、T254S、T256F,如属于 Ward 的美国专利 6,277,375 中所描述的。备选地,为了增加生物学半衰期,可在 CH1 或 CL 区域中改变抗体以包含取自 IgG 的 Fc 区域的 CH2 结构域的 2 个环的补救受体结合表位,如属于 Presta 等人的美国专利 5,869,046 和 6,121,022 中所描述的。

[0184] 在其他情况下,通过用不同的氨基酸残基置换至少一个氨基酸残基来改变 Fc 区域,从而改变抗体的效应子功能。例如,可使用不同的氨基酸残基置换选自氨基酸残基 234、235、236、237、297、318、320 和 322 的一个或多个氨基酸以便抗体具有改变的对效应子配体的亲和力但仍然保持亲本抗体的抗原结合能力。对于其的亲和力被改变的效应子配体可以是例如,Fc 受体或补体的 C1 成分。该方法更详细地描述于属于 Winter 等人的美国专利 5,624,821 和 5,648,260 中。

[0185] 在另一种情况下,可用不同氨基酸残基置换选自氨基酸残基 329、331 和 322 的一个或多个氨基酸以便抗体具有改变的 C1q 结合和 / 或减少的或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。该方法更详细地描述于属于 Idusogie 等人的美国专利 6,194,551 中。

[0186] 在另一个实例中,改变氨基酸位点 231 和 239 内的一个或多个氨基酸残基,从而改变抗体结合补体的能力。该方法进一步描述于属于 Bodmer 等人的 PCT 公开案 W0 94/29351。

[0187] 在另一个实例中,通过修饰下列位点上的一个或多个氨基酸来修饰 Fc 区域以增加抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和 / 或增加抗体对 Fc γ 受体的亲和力:238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、

285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 或 439。该方法进一步描述于属于 Presta 的 PCT 公开案 WO 00/42072。此外,已对人 IgG1 上用于 Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII 和 FcRn 的结合部位作图并且已描述了具有提高的结合的变体(参见 Shields, R. L. 等人 (2001) J. Biol. Chem. 276 :6591-6604)。位点 256、290、298、333、334 和 339 上的特定突变经显示提高了对 Fc γ RIII 的结合。此外,下列组合突变体经显示提高 Fc γ RIII 结合:T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224A 和 S298A/E333A/K334A。例如,本文中描述的 22B5/DLE 抗体使用 IgG 同种型的 IgG1 亚类,但已通过定点诱变整合了下列突变(与野生型 IgG1 亚类比较):S247D; A338L 和 I340E。类似地,如在下面更详细地描述的,已将这样的 S247D、A338L 和 I340E 突变导入 24C7、1D9 和 2D2 单克隆抗体。如在实施例中进行进一步描述的,此类突变可增加抗体对 Fc γ 受体的亲和力,从而增加其效应子功能。因此,本公开内容提供了在 Fc 区域中包含至少一个突变并且与不包含所述至少一个突变的相同抗体相比具有可检测的更大的 ADCC 应答的抗体。

[0188] 在另一个实例中,修饰抗体的糖基化。例如,可产生非糖基化抗体(即,抗体不存在糖基化)。可改变糖基化以例如,增加抗体对抗原的亲和力。此类糖修饰可通过例如,改变抗体序列中的一个或多个糖基化位点来实现。例如,可进行一个或多个氨基酸置换,所述氨基酸置换导致一个或多个可变区构架糖基化位点消除,从而消除在该位点上的糖基化。此类非糖基化可增加抗体对抗原的亲和力。这样的方法更详细地描述于 Co 等人的美国专利 5,714,350 和 6,350,861 中。

[0189] 另外或备选地,可制备具有改变的糖基化类型的抗体,例如具有减少的岩藻糖基残基量的低岩藻糖基化的(hypofucosylated)抗体或具有增加的平头型 GlcNAc 结构的抗体。此类改变的糖基化模式经证明增加抗体的 ADCC 能力。此类糖修饰可通过例如,在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体来完成。具有改变的糖基化机制的细胞已在本领域内进行了描述并且可用作宿主细胞以表达本公开内容的重组抗体从而产生具有改变的糖基化的抗体。例如,细胞系 Ms704、Ms705 和 Ms709 不存在岩藻糖基转移酶基因 FUT8(α (1,6) 岩藻糖基转移酶),以便在 Ms704、Ms705 和 Ms709 细胞系中表达的抗体在它们的糖上缺乏岩藻糖。使用两个置换载体通过靶向破坏 CHO/DG44 细胞中的 FUT8 基因来产生 Ms704、Ms705 和 Ms709 FUT8^{-/-} 细胞系(参见 Yamane 等人的美国专利公开案 20040110704 和 Yamane-Ohnuki 等人 (2004) Biotechnol Bioeng 87 :614-22)。作为另一个实例,属于 Hanai 等人的 EP 1,176,195 描述了具有功能上被破坏的 FUT8 基因(其编码岩藻糖基转移酶)的细胞系,以便通过减少或消除 α 1,6 键相关的酶,使这样的细胞系中表达的抗体展示低岩藻糖基化。Hanai 等人还描述了具有较低的将岩藻糖加至结合抗体的 Fc 区域的 N-乙酰葡萄糖胺的酶活性或不具有酶活性的细胞系,例如大鼠骨髓瘤细胞系 YB2/0(ATCC CRL1662)。属于 Presta 的 PCT 公开案 WO 03/035835 描述了变异 CHO 细胞系 Lee 13 细胞,其具有减少的将岩藻糖连接至 Asn(297)-连接的糖的能力,从而也导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化(也参见 Shields, R. L. 等人 (2002) J. Biol. Chem. 277 :26733-26740)。属于 Umana 等人的 PCT 公开案 WO 99/54342 描述了经工程改造表达糖蛋白修饰糖基转移酶(例如, β (1,4)-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶 III(GnTIII))的细胞系以便工程改造的细胞系中表

达的抗体展示增加的平分型 GlcNac 结构,所述结构导致增加的抗体的 ADCC 活性(也参见 Umana 等人(1999)Nat. Biotech. 17:176-180)。备选地,可使用岩藻糖苷酶切除抗体的岩藻糖残基。例如,岩藻糖苷酶 α -L-岩藻糖苷酶从抗体除去岩藻糖残基(Tarentino, A. L. 等人(1975)Biochem. 14:5516-23)。

[0190] 本公开内容涉及的本文中的抗体的另一种修饰是 PEG 化(pegylation)。可 PEG 化抗体以例如增加抗体的生物学(例如,血清)半衰期。为了 PEG 化抗体,通常将抗体或其片段与聚乙二醇(PEG)例如 PEG 的反应性酯或醛衍生物在其中一个或多个 PEG 基团连接至抗体或抗体片段的条件下反应。一般地,通过与反应性 PEG 分子(或类似的反应性水溶性聚合物)的酰化反应或烷基化反应来进行 PEG 化。如本文中所使用的,术语“聚乙二醇”意欲包括已用于衍生其他蛋白质的任何形式的 PEG,例如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些情况下,待 PEG 化的抗体是非糖基化抗体。用于 PEG 化蛋白质的方法在本领域内是已知的并且可用于本公开内容的抗体。参见,例如,属于 Nishimura 等人的 EP 0 154 316 和属于 Ishikawa 等人的 EP 0 401 384。

[0191] 工程改造抗体的方法

[0192] 如上所论述的,通过修饰 V_H 和 / 或 V_L 序列或与其连接的恒定区,可将具有本文中公开的 V_H 和 V_L 序列的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体用于产生新型抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体。因此,在本公开内容的另一个方面,本公开内容的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体例如 22B5、24C7、1D9 或 2D2 的结构特征用于产生结构上相关的保持本公开内容的抗体的至少一个功能性质(例如结合人 $\alpha 5 \beta 1$)的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体。例如,可将 22B5、24C7、1D9 或 2D2 的一个或多个 CDR 区或其突变形式与已知的构架区和 / 或其他 CDR 重组地组合来产生本公开内容的另外的重组工程改造的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体,如上所论述的。其他类型的修饰包括前面部分中描述的修饰。用于工程改造方法的起始材料是本文中提供的一个或多个 V_H 和 / 或 V_L 序列或其一个或多个 CDR 区。为了产生工程改造的抗体,不必实际制备(即,表达蛋白质)具有本文中提供的一个或多个 V_H 和 / 或 V_L 序列或其一个或多个 CDR 区的抗体。相反,序列中包含的信息可用作起始材料来产生来源于原始序列的“第二代”序列,然后制备“第二代”序列并且将其表达为蛋白质。

[0193] 因此,在另一个方面,本公开内容提供制备抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的方法,其包括:

[0194] (a) 提供:(i) 包含选自 SEQ ID NO:1、13、23 和 33 的 CDR1 序列、选自 SEQ ID NO:2、14、24 和 34 的 CDR2 序列和 / 或选自 SEQ ID NO:3、15、25 和 35 的 CDR3 序列的重链可变区抗体序列;和 / 或(ii) 包含选自 SEQ ID NO:4、16、26 和 36 的 CDR1 序列、选自 SEQ ID NO:5、17、27 和 37 的 CDR2 序列和 / 或选自 SEQ ID NO:6、18、28 和 38 的 CDR3 序列的轻链可变区抗体序列;

[0195] (b) 改变重链可变区抗体序列和 / 或轻链可变区抗体序列中的至少一个氨基酸残基以产生至少一个改变的抗体序列;和

[0196] (c) 将改变的抗体序列表达为蛋白质。

[0197] 标准分子生物学技术可用于制备和表达改变的抗体序列。

[0198] 优选,由改变的抗体序列编码的抗体是保持本文中描述的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的一个、一些或所有功能性质的抗体,所述功能性质包括但不限于:

[0199] (i) 以 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更小的 K_D 结合人 $\alpha 5 \beta 1$;

[0200] (ii) 能够诱导 ADCC。

[0201] 可使用可在本领域内获得的和 / 或本文中描述的标准测定法例如实施例中所示的测定法 (例如, 流式细胞术、结合测定法) 评估改变的抗体的功能性质。

[0202] 在工程改造本公开内容的抗体的方法的某些方面, 可随机地或选择性地沿着抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体编码序列的全部或部分导入突变, 并且可就本文中所描述的结合活性和 / 或其他功能性质筛选所得的经修饰的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体。突变方法已在本领域中进行了描述。例如, 属于 Short 的 PCT 公开案 W0 02/092780 描述了使用饱和诱变、合成连接装配或其组合产生和筛选抗体突变的方法。备选地, 属于 Lazar 等人的 PCT 公开案 W0 03/074679 描述了使用计算机化筛选方法最优化抗体的物理化学性质的方法。

[0203] 编码本公开内容的抗体的核酸分子

[0204] 本公开内容的另一方面涉及编码本公开内容的抗体的核酸分子。核酸可存在完整细胞中、细胞裂解物中或以部分纯化或大体上纯化的形式存在。当通过任何合适的技术, 包括碱性 / SDS 处理、CsCl 分带 (CsCl banding)、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和其他技术从其他细胞组分或其他污染物例如其他细胞核酸或蛋白质中纯化出来时, 核酸是“分离的”或“变得大体上纯的”。参见, F. Ausubel, 等人, ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York。本公开内容的核酸可以是例如 DNA 或 RNA 并且可以包含或不包含内含子序列。通常, 核酸是 cDNA 分子。

[0205] 可使用任何合适的分子生物学技术获得本公开内容的核酸。对于通过杂交瘤 (例如, 如下面进一步描述的, 从携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠制备的杂交瘤) 表达的抗体, 可通过 PCR 扩增或 cDNA 克隆技术获得编码杂交瘤产生的抗体的轻链和重链的 cDNA。对于从免疫球蛋白基因文库获得的抗体 (例如, 使用噬菌体展示技术), 可从文库回收编码抗体的核酸。

[0206] 本公开内容的核酸分子包括例如, 编码 22B5 单克隆抗体的 V_H 和 V_L 序列的核酸分子。编码 22B5 的 V_H 序列的 DNA 序列示于 SEQ ID NO :11 中。编码 22B5 的 V_L 序列的 DNA 序列示于 SEQ ID NO :12 中。本文中公开的其他举例说明性核酸分子是编码 24C7、1D9 和 2D2 单克隆抗体的 V_H 和 V_L 序列的核酸分子。编码 24C7 的 V_H 序列的 DNA 序列示于 SEQ ID NO :21 中。编码 24C7 的 V_L 序列的 DNA 序列示于 SEQ ID NO :22 中。编码 1D9 的 V_H 序列的 DNA 序列示于 SEQ ID NO :31 中。编码 1D9 的 V_L 序列的 DNA 序列示于 SEQ ID NO :32 中。编码 2D2 的 V_H 序列的 DNA 序列示于 SEQ ID NO :41 中。编码 2D2 的 V_L 序列的 DNA 序列示于 SEQ ID NO :42 中。

[0207] 一旦获得编码 V_H 和 V_L 区段的 DNA 片段, 可通过任何合适的重组 DNA 技术进一步操作这些 DNA 片段, 例如以将可变区基因转变成全长抗体链基因、Fab 片段基因或 scFv 基因。在此类操作中, 将编码 V_L 或 V_H 的 DNA 片段与编码另一种蛋白质例如抗体恒定区或柔软的连接体的另一个 DNA 片段有效连接。术语“有效连接的”, 如本说明书中使用的, 意指连接两个 DNA 片段以使由两个 DNA 片段编码的氨基酸序列保持符合读框。

[0208] 可通过将编码 V_H 的 DNA 与编码重链恒定区 (CH1、CH2 和 CH3) 的另一个 DNA 分子有效连接来将编码 V_H 区的分离的 DNA 转变成全长重链基因。人重链恒定区基因的序列在本领域内是已知的 (参见例如, Kabat, E. A., 等人 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) 并且包含这些区域的 DNA 片段可通过标准 PCR 扩增获得。重链恒

定区可以是 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恒定区,但最优选是 IgG1 或 IgG4 恒定区。IgG1 恒定区序列可以是已知在不同个体间发生的各种等位基因或同种异型的任一个,例如 Gm(1)、Gm(2)、Gm(3) 和 Gm(17)。此类同种异型代表 IgG1 恒定区中天然发生的氨基酸置换。对于 Fab 片段重链基因,可将编码 V_H 的 DNA 与只编码重链 CH1 恒定区的另一个 DNA 分子有效连接。

[0209] 可通过将编码 V_L 的 DNA 与编码轻链恒定区 CL 的另一个 DNA 分子有效连接来将编码 V_L 区的分离的 DNA 转变成全长轻链基因(以及 Fab 轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列在本领域内是已知的(参见例如, Kabat, E. A., 等人 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) 并且可通过标准 PCR 扩增获得包含此类区域的 DNA 片段。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区。

[0210] 为了产生 scFv 基因,将编码 V_H 和 V_L 的 DNA 片段与编码柔软的连接体例如编码氨基酸序列 $(Gly_4-Ser)_3$ 的另一个片段有效连接,以便 V_H 和 V_L 序列可表达为 V_L 和 V_H 区通过柔软的连接体连接的连续单链蛋白质(参见,例如, Bird 等人 (1988) Science 242 :423-426 ; Huston 等人 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85 :5879-5883 ; McCafferty 等人, (1990) Nature 348 :552-554)。

[0211] 本公开内容的单克隆抗体的产生

[0212] 本公开内容的单克隆抗体 (mAb) 可通过许多技术产生,所述技术包括常规单克隆抗体方法学例如, Kohler 和 Milstein (1975) Nature 256 :495 的标准体细胞杂交技术。还可使用用于产生单克隆抗体的其他技术,例如, B 淋巴细胞的病毒或致癌性转化。

[0213] 用于制备杂交瘤的优选动物系统是鼠系统。小鼠中杂交瘤的产生是已非常良好地建立的方法。免疫方案和用于经免疫的脾细胞(用于融合)的分离的技术在本领域内是已知的。融合伴侣(例如,鼠骨髓瘤细胞)和融合方法也是已知的。

[0214] 可基于如上所述制备的鼠单克隆抗体的序列来制备本公开内容的嵌合或人源化抗体。可从目的鼠杂交瘤获得编码重链和轻链免疫球蛋白的 DNA,并且使用合适的分子生物学技术对其进行工程改造以获得非鼠(例如,人)免疫球蛋白序列。例如,为了产生嵌合抗体,可使用本领域内已知的方法(参见例如,属于 Cabilly 等人的美国专利 4,816,567) 将鼠可变区连接至人恒定区。为了产生人源化抗体,可使用本领域内已知的方法(参见例如,属于 Winter 的美国专利 5,225,539,属于 Queen 等人的美国专利 5,530,101 ; 5,585,089 ; 5,693,762 和 6,180,370) 将鼠 CDR 区插入人构架。

[0215] 在一些情况下,本公开内容的抗体是人单克隆抗体。可使用携带人免疫系统的部分而非鼠系统的转基因或转染色体小鼠产生此类抗 $\alpha 5 \beta 1$ 的人单克隆抗体。此类转基因和转染色体小鼠包括本文中分别称为 HuMAb Mouse[®] 和 KM Mouse[®] 的小鼠,且在本文中统称为“人 Ig 小鼠”。

[0216] HuMAb Mouse[®] (Medarex[®], Inc.) 包含编码未重排的人重链(μ 和 γ) 和 κ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因微小基因座和使内源 μ 和 κ 链基因座失活的靶向突变(参见例如, Lonberg, 等人 (1994) Nature 368(6474) :856-859)。因此,小鼠展示减少的小鼠 IgM 或 κ 的表达,并且响应免疫,导入的人重链和轻链转基因经历类别转换(class switching) 和体细胞突变产生高亲合力人 IgG κ 单克隆抗体 (Lonberg, N, 等人 (1994),

同上;综述于 Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101 中;Lonberg, N. 和 Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13:65-93, 以及 Harding, F. 和 Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546)。HuMAb Mouse[®]的制备和用途和此类小鼠携带的基因修饰进一步描述于 Taylor, L. 等人 (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295;Chen, J. 等人 (1993) International Immunology 5:647-656;Tuailon 等人 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724;Choi 等人 (1993) Nature Genetics 4:117-123;Chen, J. 等人 (1993) EMBO J. 12:821-830;Tuailon 等人 (1994) J. Immunol. 152:2912-2920;Taylor, L. 等人 (1994) International Immunology 6:579-591;和 Fishwild, D. 等人 (1996) Nature Biotechnology 14:845-851 中。进一步参见,全都属于 Lonberg 和 Kay 的美国专利 5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,789,650;5,877,397;5,661,016;5,814,318;5,874,299 和 5,770,429;属于 Surani 等人的美国 5,545,807;全都属于 Lonberg 和 Kay 的 PCT 公开案 WO 92/03918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97/13852、WO 98/24884 和 WO 99/45962;以及属于 Korman 等人的 PCT 公开案 WO 01/14424。

[0217] 在另一种情况下,可使用在转基因和转染色体上携带人免疫球蛋白序列的小鼠,例如携带人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠产生本公开内容的人抗体。此类小鼠,在本文中称为“KM 小鼠[™]”,详细地描述于属于 Ishida 等人的 PCT 公开案 WO 02/43478 中。

[0218] 此外,表达人免疫球蛋白基因的备选转基因动物系统在本领域内是可获得的并且可用于产生本公开内容的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体。例如,可使用称为 Xenomouse (Abgenix, Inc.) 的备选转基因系统;此类小鼠描述于例如,属于 Kucherlapati 等人的美国专利 5,939,598;6,075,181;6,114,598;6,150,584 和 6,162,963 中。

[0219] 此外,表达人免疫球蛋白基因的备选转染色体动物系统在本领域内是可获得的并且可用于产生本公开内容的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体。例如,可使用称为“TC 小鼠”的携带人重链转染色体和人轻链转染色体的小鼠;此类小鼠描述于 Tomizuka 等人 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727 中。此外,已在本领域内描述了携带人重链和轻链染色体的牛 (Kuroiwa 等人 (2002) Nature Biotechnology 20:889-894), 其可用于产生本公开内容的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体。

[0220] 还可使用用于筛选人免疫球蛋白基因的文库的噬菌体展示方法制备本公开内容的人单克隆抗体。用于分离人抗体的此类噬菌体展示方法已在本领域内建立。参见例如:属于 Ladner 等人的美国专利 5,223,409;5,403,484 和 5,571,698;属于 Dower 等人的美国专利 5,427,908 和 5,580,717;属于 McCafferty 等人的美国专利 5,969,108 和 6,172,197;以及属于 Griffiths 等人的美国专利 5,885,793;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,582,915 和 6,593,081。

[0221] 还可使用已向其中重建了人免疫细胞(以便在免疫后可产生人抗体应答)的 SCID 小鼠来制备本公开内容的人单克隆抗体。此类小鼠描述于例如属于 Wilson 等人的美国专利 5,476,996 和 5,698,767。

[0222] 人 Ig 小鼠的免疫

[0223] 当将人 Ig 小鼠用于产生本公开内容的人抗体时,如由 Lonberg, N. 等人 (1994) Nature 368(6474):856-859;Fishwild, D. 等人 (1996) Nature Biotechnology 14:845-851;和 PCT 公开案 WO 98/24884 和 WO 01/14424 中所描述的,使用纯化的或富集的

$\alpha 5\beta 1$ 抗原制备物和 / 或重组 $\alpha 5\beta 1$ 或 $\alpha 5\beta 1$ 融合蛋白免疫此类小鼠。优选,在第一次输注时小鼠为 6 至 16 周龄。例如,可使用 $\alpha 5\beta 1$ 抗原的纯化或重组制备物 (5-50 μ g) 腹膜内免疫人 Ig 小鼠。此外,相关蛋白质例如, $\alpha 5$ 和 / 或 $\beta 1$ 的多肽片段可用于免疫小鼠。例如,可将多肽片段缀合至载体分子以增加它们的免疫原性。此类载体分子在本领域内是熟知的,并且特别地,包括钥孔戚血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin)、牛血清白蛋白、甲状腺球蛋白、白喉类毒素和破伤风类毒素。

[0224] 产生抗 $\alpha 5\beta 1$ 的完全人单克隆抗体的详细方法描述于下面的实施例 1 中。使用各种抗原的累积经验 (Cumulative experience) 已显示,当用完全弗氏佐剂中的抗原腹膜内 (IP) 初始免疫,然后每隔一周用不完全弗氏佐剂中的抗原 IP 免疫 (达到总共 6 次) 时,转基因小鼠产生应答。然而,还发现除了弗氏佐剂以外的佐剂也是有效的。此外,发现在佐剂不存在的情况下完整细胞具有高度免疫原性。可在使用通过眶后放血 (retroorbital bleed) 获得的血浆样品的免疫方案的过程中监控免疫应答。可利用 ELISA (如下文中所描述的) 筛选血浆,可将具有足够滴度的抗 $\alpha 5\beta 1$ 人免疫球蛋白的小鼠用于融合。可在杀死并且取出脾脏前 3 天用抗原静脉内加强免疫小鼠。预期对于每一个免疫可能需要进行 2 至 3 次融合。对于每一种抗原,通常免疫 6 至 24 只小鼠。通常使用 HCo7 和 HCo12 品系。此外,可将 HCo7 和 HCo12 转基因一起培育入具有两个不同人重链转基因 (HCo7/HCo12) 的单个小鼠。备选地或另外地,可如实施例 1 中所述,使用 KM Mouse[®] 品系。

[0225] 产生人单克隆抗体的杂交瘤的产生

[0226] 为了产生用于产生本公开内容的人单克隆抗体的杂交瘤,可分离来自经免疫的小鼠的脾细胞和 / 或淋巴节细胞,然后将其融合至合适的永生化细胞系,例如小鼠骨髓瘤细胞系。可就抗原特异性抗体的产生筛选所得的杂交瘤。例如,可使用 50% 的 PEG 将来自经免疫的小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬浮液与 1/6 数目的 P3X63-Ag8.653 非分泌型小鼠骨髓瘤细胞 (ATCC, CRL 1580) 融合。将细胞以大约 2×10^5 个涂板在平底微量滴定板上,然后在含有 20% 胎儿克隆血清 (fetal Clone Serum)、18% "653" 条件化培养基、5% 三甲氧唑辛 (IGEN)、4mM L-谷氨酰胺、1mM 丙酮酸钠、5mM HEPES、0.055mM 2-巯基乙醇、50 单位 /ml 青霉素、50mg/ml 链霉素、50mg/ml 庆大霉素和 1X HAT (Sigma; 在融合后 24 小时加入 HAT) 的选择培养基中温育 2 周。在大约 2 周后,将细胞培养在其中用 HT 替代了 HAT 的培养基中。然后利用 ELISA 就人单克隆 IgM 和 IgG 抗体筛选单独的孔。当大量的杂交瘤生长发生时,通常可在 10 至 14 天后观察培养基。将分泌抗体的杂交瘤再涂板,再筛选,如果对于人 IgG 仍然呈阳性,则通过有限稀释将单克隆抗体亚克隆至少 2 次。然后可在体外培养稳定的亚克隆以在组织培养基中产生少量的抗体用于表征。

[0227] 为了纯化人单克隆抗体,可将选择的杂交瘤培养在 2 升转瓶 (spinner-flask) 中以用于单克隆抗体纯化。可在使用蛋白 A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, N. J.) 进行亲和层析之前过滤和浓缩上清液。可通过凝胶电泳和高效液相色谱检查洗脱的 IgG 以确保纯度。可将缓冲液换成 PBS,然后可使用 1.43 的消光系数利用 OD280 测定浓度。可将单克隆抗体等分,然后在 -80°C 下贮存。

[0228] 产生单克隆抗体的转染瘤的产生

[0229] 还可使用例如本领域内熟知的重组 DNA 技术和基因转染方法的组合 (例如, Morrison, S. (1985) Science 229:1202) 来在宿主细胞转染瘤中产生本公开内容的抗体。

[0230] 例如,为了表达抗体或其抗体片段,可通过标准分子生物学技术(例如,PCR扩增或使用表达目的抗体的杂交瘤或噬菌体的cDNA克隆)来获得编码部分或全长轻链和重链的DNA,然后可将DNA插入表达载体以便将基因与转录和翻译控制序列有效连接。在本说明书中,术语“有效连接的”意指将抗体基因连接入载体以便载体中的转录和翻译控制序列发挥它们的期望的调控抗体基因的转录和翻译的功能。选择与使用的表达宿主细胞相容的表达载体和表达控制序列。可将抗体轻链基因和抗体重链基因插入分开的载体或更常见地,将两个基因插入相同的表达载体。通过任何合适的方法(例如,连接抗体基因片段与载体上的互补限制性位点,或如果不存在限制性位点进行平端连接)将抗体基因插入表达载体。可使用本文中描述的抗体的轻链和重链可变区,通过将它们插入已编码期望的同种型和亚类的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体(以便 V_H 区段与载体内的 C_H 区段有效连接以及 V_K 区段与载体内的 C_L 区段有效连接)来产生任何抗体同种型和亚类的全长抗体基因。此外或备选地,重组表达载体可编码促进抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。可将抗体链基因克隆入载体以便信号肽符合读框地连接至抗体链基因的氨基末端。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即,来自非免疫球蛋白蛋白质的信号肽)。

[0231] 除了抗体链基因外,本公开内容的重组表达载体通常具有控制抗体链基因在宿主细胞中的表达的调控序列。术语“调控序列”意在包括控制抗体链基因的转录或翻译的启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,多腺苷酸化信号)。此类调控序列描述于例如Goeddel(Gene Expression Technology.Methods in Enzymology 185,Academic Press, San Diego,CA(1990))中。本领域技术人员将理解,表达载体的设计,包括调控序列的选择,可取决于这样的因素如待转化的宿主细胞的选择、期望的蛋白质表达水平等。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调控序列包括在哺乳动物细胞中指导高水平蛋白质表达的病毒元件,例如来源于巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)、腺病毒(例如,腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和多瘤病毒的启动子和/或增强子。备选地,可使用非病毒调控序列,例如泛素启动子或 β -珠蛋白启动子。此外,调控元件可由来自不同来源的序列组成,例如SR启动子系统,其包含来自SV40早期启动子和人T细胞白血病病毒I型的长末端重复的序列(Takebe, Y. 等人(1988)Mol. Cell. Biol. 8:466-472)。

[0232] 除了抗体链基因和调控序列外,本公开内容的重组表达载体还可具有额外的序列,例如调控载体在宿主细胞中复制的序列(例如,复制起点)和选择标记基因。选择标记基因帮助选择已向其中导入了载体的宿主细胞(参见,例如,全都属于Axe1的美国专利4,399,216、4,634,665和5,179,017)。例如,通常选择标记基因赋予已向其中导入了载体的宿主细胞对药物例如G418、潮霉素或甲氨蝶呤的抗性。选择标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(与甲氨蝶呤选择/扩增一起用于dhfr-宿主细胞)和neo基因(用于G418选择)。

[0233] 为了轻链和重链的表达,通过任何合适的技术将编码重链和轻链的表达载体转染入宿主细胞。术语“转染”的各种形式意在包括众多的通常用于将外源DNA导入原核或真核宿主细胞的技术,例如,电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等。虽然可以在原核或真核宿主细胞中表达本公开内容的抗体,但最常见地在真核细胞,通常哺乳动物宿主细胞中表达抗体。

[0234] 用于表达本公开内容的重组抗体的哺乳动物宿主细胞包括例如中国仓鼠卵

巢 (CHO) 细胞 (包括 dhfr-CHO 细胞, 描述于 Urlaub 和 Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 中, 与 DHFR 选择标记一起使用, 例如如在 R. J. Kaufman 和 P. A. Sbarp (1982) Mol. Biol. 159:601-621 中描述的)、NS0 骨髓瘤细胞、COS 细胞和 Sp2 细胞。特别地, 为了与 NS0 骨髓瘤或 CHO 细胞一起使用, 另一种表达系统是 W0 87/04462、W0 89/01036 和 EP 338, 841 中公开的 GS (谷氨酰胺合成酶) 基因表达系统。当将编码抗体基因的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞时, 可通过将宿主细胞培养足以允许抗体在宿主细胞中表达或抗体分泌入宿主细胞在其中生长的培养基的时间来产生抗体。可使用任何合适的蛋白质纯化方法从培养基回收抗体。

[0235] 结合抗原的抗体的表征

[0236] 可通过例如标准 ELISA 就对 $\alpha 5 \beta 1$ 的结合测试本公开内容的抗体或其抗原结合部分。简而言之, 用纯化的 $\alpha 5 \beta 1$ 以 $0.25 \mu\text{g/ml}$ (于 PBS 中) 包被微量滴定板, 然后用 5% 的于 PBS 中的牛血清白蛋白进行封闭。向各孔中加入抗体的稀释物 (例如, 来自 $\alpha 5 \beta 1$ 免疫的小鼠的血浆的稀释物), 然后在 37°C 下温育 1 至 2 小时。用 PBS/Tween 清洗板, 然后用缀合至碱性磷酸酶的第二试剂 (例如, 对于人抗体, 山羊抗人 IgG Fc- 特异性多克隆试剂) 在 37°C 下温育 1 小时。在清洗后, 用 pNPP 底物 (1mg/ml) 对板进行显色, 在 405-650 的 OD 处进行分析。优选, 将产生最高滴度的小鼠用于融合。

[0237] 还可将上述 ELISA 测定用于筛选显示与 $\alpha 5 \beta 1$ 免疫原的阳性反应性的杂交瘤。亚克隆以高亲合力结合 $\alpha 5 \beta 1$ 的杂交瘤, 并且进行进一步表征。可从各杂交瘤选择一个克隆 (其保持亲本细胞的反应性 (通过 ELISA)) 用于制备 5 至 10 小瓶细胞库 (于 -140°C 下贮存) 和用于抗体纯化。

[0238] 为了纯化抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体, 可将选择的杂交瘤培养在 2 升转瓶中以用于单克隆抗体纯化。可在使用蛋白 A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ) 进行亲和层析之前过滤和浓缩上清液。通过凝胶电泳和高效液相色谱检查洗脱的 IgG 以确保纯度。可将缓冲液更换成 PBS, 然后使用 1.43 的消光系数利用 OD_{280} 测定浓度。将单克隆抗体等分并且于 -80°C 下贮存。

[0239] 此外, 可通过本领域内已知的标准方法表征被抗体结合的表位。此类方法包括产生 $\alpha 5$ 和 / 或 $\beta 1$ 的交叠肽片段的阵列, 然后评估抗体对各种片段的结合。备选地, 可将突变, 例如其中用丙氨酸残基置换各氨基酸的丙氨酸扫描诱变, 导入 $\alpha 5$ 和 / 或 $\beta 1$ 肽, 可将抗体对突变体肽的结合与抗体对野生型蛋白质的结合相比较, 从而鉴定其中突变影响结合的位点。参见, 例如, Cunningham 等人, (1989) Science 244:1081-1085。

[0240] 为了确定选择的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 单克隆抗体或其抗原结合部分是否结合独特的表位, 可使用可商购获得的试剂 (Pierce, Rockford, IL) 生物素化各抗体。如上所述, 可使用 $\alpha 5 \beta 1$ 包被的 -ELISA 板进行使用未标记的单克隆抗体和生物素化的单克隆抗体的竞争研究。可使用链霉抗生物素蛋白碱性磷酸酶探针检测生物素化的 mAb 的结合。

[0241] 为了确定纯化的抗体的同种型, 可使用特异于特定同种型的抗体的试剂进行同种型 ELISA。例如, 为了确定人单克隆抗体的同种型, 可用 $1 \mu\text{g/ml}$ 的抗人免疫球蛋白在 4°C 下包被微量滴定板的孔, 进行过夜。在用 1% BSA 封闭后, 将板与 $1 \mu\text{g/ml}$ 或更少的测试单克隆抗体或纯化的同种型对照在环境温度下反应, 进行 1 至 2 小时。然后可将孔与人 IgG1 或人 IgM- 特异性碱性磷酸酶缀合的探针反应。如上所述对板进行显色和分析。

[0242] 还可通过 Western 印迹,使用 $\alpha 5 \beta 1$ 抗原就反应性测试抗 $\alpha 5 \beta 1$ 人 IgG。简而言之,可制备 $\alpha 5 \beta 1$,使其经历十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后,将分开的抗原转移至硝酸纤维素膜,用 10% 胎牛血清封闭,然后用待测单克隆抗体进行探测。使用抗人 IgG 碱性磷酸酶检测人 IgG 结合,用 BCIP/NBT 底物片剂 (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.) 进行显色。

[0243] 免疫缀合物

[0244] 在另一个方面,本公开内容的特征在于缀合至治疗性部分例如细胞毒素、药物(例如,免疫抑制剂)或放射性毒素的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体或其片段。此类缀合物在本文中称为“免疫缀合物”。包含一个或多个细胞毒素的免疫缀合物称为“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒素剂包括对细胞有害(例如,杀伤)的任何试剂。实例包括紫杉醇、细胞松弛素 B、短杆菌肽 D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、鬼臼噻吩甙(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羟基蒽醌二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌、普卡霉素、放线菌素 D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素以及其类似物或同源物。治疗剂还包括,例如,抗代谢药(例如,甲氨蝶呤,6-巯基嘌呤,6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷,5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪(decarbazine)、烷化剂(例如,氮芥、塞替派(thioepa) 苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU) 和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素 C,以及顺二氯二氨基铂(II)(DDP) 顺铂)、蒽环类抗生素(例如,柔红霉素(以前称为道诺霉素)和多柔比星)、抗生素(例如,放线菌素 D(以前称为放线菌素),博来霉素、普卡霉素和安曲霉素(AMC)),和抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱)。

[0245] 可缀合至本公开内容的抗体或其抗原结合部分的治疗性细胞毒素的其他实例包括多卡米星(duocarmycin)、刺孢霉素、美登素和 auristatin 和其衍生物。刺孢霉素抗体缀合物的实例是可商购获得的(MyloTarg™; Wyeth-Ayerst)。

[0246] 可使用不同的连接体技术将细胞毒素缀合至本公开内容的抗体或其抗原结合部分。已用于将细胞毒素缀合至抗体的连接体类型的实例包括但不限于脲、硫醚、酯、二硫化物和含肽连接体。可选择例如易于被溶酶体区室中低 pH 切割的或易于被蛋白酶例如优先在肿瘤组织中表达的蛋白酶(例如组织蛋白酶(例如,组织蛋白酶 B、C、D))切割的连接体。

[0247] 为了进一步论述细胞毒素、连接体的类型和用于将治疗剂缀合至抗体的方法,也参见 Saito, G. 等人 (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail, P. A. 等人 (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, T. M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan, I. 和 Kreitman, R. J. (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter, P. D. 和 Springer, C. J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264。

[0248] 还可将本公开内容的抗体或其抗原结合部分缀合至放射性同位素以产生也称为放射免疫缀合物(radioimmunoconjugate)的细胞毒性放射性药物。可被缀合至抗体以进行诊断或治疗应用的放射性同位素的实例包括但不限于碘¹³¹、钆¹¹¹、钇⁹⁰和镱¹⁷⁷。本领域中已建立用于制备放射免疫缀合物的方法。放射免疫缀合物的实例是可商购获得的,包括 Zevalin™(IDEC Pharmaceuticals) 和 Bexxar™(Corixa Pharmaceuticals),并且可使用相似的方法,使用本公开内容的抗体制备放射免疫缀合物。

[0249] 本公开内容的抗体缀合物可用于修饰给定的生物学应答,并且药物部分不被解释为限于经典化学治疗剂。例如,药物部分可以是加工期望的生物学活性的蛋白质或多肽。此类蛋白质可包括例如酶促活性毒素或其活性片段,例如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白 A(ricin A)、假单胞菌外毒素或白喉毒素;蛋白质例如肿瘤坏死因子或干扰素- γ ;或,生物学应答修饰剂例如,淋巴因子、白细胞介素-1(“IL-1”)、白细胞介素-2(“IL-2”)、白细胞介素-6(“IL-6”)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(“GM-CSF”)、粒细胞集落刺激因子(“G-CSF”)或其他生长因子。

[0250] 用于将此类治疗部分缀合至抗体的技术是已知的,参见,例如,Arnon 等人,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”,于 Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy 中,Reisfeld 等人 (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 等人,“Antibodies For Drug Delivery”,于 Controlled Drug Delivery (第 2 版) 中,Robinson 等人 (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, 于 Monoclonal Antibodies' 84: Biological And Clinical Applications 中, Pinchera 等人 (eds.), pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, 于 Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy 中, Baldwin 等人 (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 和 Thorpe 等人, “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”. Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)。

[0251] 双特异性分子

[0252] 在另一个方面,本公开内容特征在于包含本公开内容的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体或其片段的双特异性分子。本公开内容的抗体或其抗原结合部分可被衍生或连接至另一个功能性分子,例如另一个肽或蛋白质(例如,另一个抗体或受体的配体)以产生结合至少两个不同结合部位或靶分子的双特异性分子。事实上,本公开内容的抗体可被衍生或连接至多于一个的其他的功能性分子以产生结合 2 个以上的不同结合部位和/或靶分子的多特异性分子;此类多特异性分子也意欲包括在本文中所使用的术语“双特异性分子”中。为了产生本公开内容的双特异性分子,可将本公开内容的抗体功能性连接(例如,通过化学偶联、基因融合、非共价结合等)至一个或多个其他的结合分子例如另一个抗体、抗体片段、肽或结合模拟物,以便产生双特异性分子。

[0253] 因此,本公开内容包括双特异性分子,其包含至少一个对于 $\alpha 5 \beta 1$ 的第一结合特异性和对于第二靶表位的第二结合特异性。在本公开内容的特定方面,第二靶表位是 Fc 受体,例如,人 Fc γ RI (CD64) 或人 Fc γ 受体 (CD89)。因此,本公开内容包括能够结合 Fc γ R 或表达 Fc γ R 的效应细胞(例如,单核细胞、巨噬细胞或多形核细胞 (PMN)) 和表达 $\alpha 5 \beta 1$ 的靶细胞的双特异性分子。此类双特异性分子将表达 $\alpha 5 \beta 1$ 的细胞靶向效应细胞并且触发 Fc 受体介导的效应细胞活性,例如表达 $\alpha 5 \beta 1$ 的细胞的吞噬、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)、细胞因子释放或超氧阴离子 (superoxide anion) 的产生。

[0254] 在其中双特异性分子是多特异性的本公开内容的方面,除了抗 Fc 结合特异性和抗 $\alpha 5 \beta 1$ 结合特异性外,分子还可包括第三结合特异性。在一种情况下,第三结合特异性是抗增强因子 (EF) 部分,例如,结合参与细胞毒性活性的表面蛋白,从而增加抗靶细胞的

免疫应答的分子。“抗增强因子部分”可以是结合给定的分子例如抗原或受体,从而导致 Fc 受体或靶细胞抗原的结合决定簇的效应增强的抗体或功能性抗体片段或配体。“抗增强因子部分”可结合 Fc 受体或靶细胞抗原。备选地,抗增强因子部分可结合与第一和第二结合特异性所结合的实体不同的实体。例如,抗增强因子部分可结合细胞毒性 T 细胞(例如通过 CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1 或导致增加的抗靶细胞的免疫应答的其他免疫细胞)。

[0255] 在一种情况下,本公开内容的双特异性分子包含至少一个抗体或其抗体片段,包括例如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 或单链 Fv 作为结合特异性。抗体还可以是轻链或重链二聚体或其任何最小片段例如 Fv 或单链构建体,如 Ladner 等人的美国专利 4,946,778 中描述的。

[0256] 在一种情况下,对于 Fc γ 受体的结合特异性由单克隆抗体提供,其结合不被人免疫球蛋白 G(IgG) 阻断。如本文中所使用的,术语“IgG 受体”是指位于 1 号染色体上的 8 个 γ 链基因的任一个。此类基因编码总共 12 个跨膜或可溶性受体同种型,所述受体同种型可分类为 3 个 Fc γ 受体类型:Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32) 和 Fc γ RIII (CD16)。在一种情况下,Fc γ 受体是人高亲和力 Fc γ RI。人 Fc γ RI 是 72kDa 分子,其显示对于单体 IgG 的高亲和力 (10^8 – 10^9 M⁻¹)。

[0257] 某些抗 Fc γ 单克隆抗体的产生和特征在 Fanger 等人的 PCT 公开案 WO 88/00052 和美国专利 4,954,617 中进行了描述。此类抗体在与受体的 Fc γ 结合部位不同的部位上结合 Fc γ RI、Fc γ RI I 或 Fc γ RIII 的表位,因此,它们的结合基本上不被生理水平的 IgG 阻断。用于本公开内容的特异性抗 Fc γ RI 抗体是 mAb 22、mAb 32、mAb 44、mAb 62 和 mAb 197。产生 mAb 32 的杂交瘤可从美国典型培养物保藏中心,ATCC 登录号 HB9469 获得。在其他情况下,抗 Fc γ 受体抗体是单克隆抗体 22 的人源化形式 (H22)。H22 抗体的产生和特征描述于 Graziano, R. F. 等人 (1995) J. Immunol 155(10):4996–5002 和 PCT 公开案 W094/10332 中。产生 H22 抗体的细胞系以名称 HA022CL1 保藏在美国典型培养物保藏中心,并且具有登录号 CRL 11177。

[0258] 在其他情况下,对于 Fc 受体的结合特异性由结合人 IgA 受体例如 Fc α 受体 (Fc α RI (CD89)) 的抗体提供,其结合通常不被人免疫球蛋白 A (IgA) 阻断。术语“IgA 受体”意在包括位于 19 号染色体上的一个 α -基因 (Fc α RI) 的基因产物。已知该基因编码数个 55 至 110 kDa 的选择性剪接的跨膜同种型。Fc α RI (CD89) 在单核细胞/巨噬细胞、嗜酸性和嗜中性粒细胞上(但不在非效应细胞群体上)组成型表达。Fc α RI 具有对于 IgA1 和 IgA2 的中等亲和力(约等于 5×10^7 M⁻¹),当暴露于细胞因子例如 G-CSF 或 GM-CSF 时,该亲和力增加 (Morton, H. C. 等人 (1996) Critical Reviews in Immunology 16:423–440)。鉴定为 A3、A59、A62 和 A77 的 4 个 Fc α RI-特异性单克隆抗体(其在 IgA 配体结合结构域的外部结合 Fc α RI) 已进行了描述 (Monteiro, R. C. 等人 (1992) J. Immunol. 148:1764)。

[0259] Fc α RI 和 Fc γ RI 是用于本公开内容的双特异性分子的举例说明性触发受体,因为它们 (1) 主要在免疫效应细胞例如单核细胞、PMN、巨噬细胞和树突细胞上表达;(2) 以高水平(例如,5,000–100,000 个/细胞)表达;(3) 是细胞毒性活性(例如,ADCC、吞噬作用)的介体;(4) 介导增强的靶向它们的抗原(包括自体抗原)的抗原呈递。

[0260] 虽然人单克隆抗体是优选的,但可用于本公开内容的双特异性分子的其他抗体可

以是鼠、嵌合和人源化单克隆抗体。

[0261] 可使用任何合适的方法,通过缀合组成结合特异性例如抗 FcR 和抗 $\alpha 5 \beta 1$ 结合特异性来制备本公开内容的双特异性分子。例如,可分开产生双特异性分子的各结合特异性,然后彼此缀合。当结合特异性是蛋白质或肽时,可将多种偶联或交联剂用于共价缀合。交联剂的实例包括蛋白 A、碳二亚胺、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基-硫代乙酸酯 (SATA)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB)、邻-苯二马来酰亚胺 (oPDM)、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯 (SPDP) 和 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯 (sulfo-SMCC) (参见例如, Karpovsky 等人 (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA 等人 (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。其他方法包括 Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan 等人 (1985) Science 229:81-83, 和 Glennie 等人 (1987) J. Immunol. 139:2367-2375 中描述的方法。合适的缀合剂包括 SATA 和 sulfo-SMCC, 两者都可从 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL) 获得。

[0262] 当结合特异性是抗体时,可通过两条重链的 C 端铰链区的巯基键合来缀合它们。在一种情况下,在缀合前,修饰铰链区以包含奇数个巯基残基例如 1 个残基。

[0263] 备选地,可在相同的载体中编码两个结合特异性,和可在相同的宿主细胞中表达和装配两个结合特异性。当双特异性分子是 mAb x mAb、mAb x Fab、Fab x F(ab')₂ 或配体 x Fab 融合蛋白时,该方法特别有用。本公开内容的双特异性分子可以是包含一个单链抗体和结合决定簇的单链分子或包含 2 个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性分子可包含至少 2 个单链分子。用于制备双特异性分子的方法描述于例如美国专利 5,260,203; 美国专利 5,455,030; 美国专利 4,881,175; 美国专利 5,132,405; 美国专利 5,091,513; 美国专利 5,476,786; 美国专利 5,013,653; 美国专利 5,258,498 和美国专利 5,482,858 中。

[0264] 双特异性分子对它们的特异性靶的结合可通过例如,酶联免疫吸附测定 (ELISA)、放射免疫测定 (RIA)、FACS 分析、生物测定 (例如,生长抑制) 或 Western 印迹分析来确认。此类测定中的每一个通常通过使用特异于目的复合物的标记试剂 (例如,抗体) 来检测特定目的蛋白质-抗体复合物的存在。例如,可使用例如,识别和特异性结合抗体-FcR 复合物的酶联抗体或抗体片段检测 FcR-抗体复合物。备选地,可使用多种其他的免疫测定法中的任一个检测复合物。例如,可放射性标记抗体,然后将其用于放射免疫测定 (RIA) (参见,例如, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986)。可利用这样的方法如使用 γ 计数器或闪烁计数器或利用放射自显影术检测放射性同位素。

[0265] 药物组合物

[0266] 在另一个方面,本公开内容提供了组合物例如药物组合物,其包含与可药用载体一起配制的一种或组合的本公开内容的单克隆抗体或其抗原结合部分。此类组合物可包含的一种或组合的 (例如,两种或更多种不同的) 本公开内容的抗体或免疫缀合物或双特异性分子。例如,本公开内容的药物组合物可包含结合靶抗原上的不同表位或具有补体活性的抗体 (或免疫缀合物或双特异性分子) 的组合。

[0267] 还可以以联合治疗即与其他试剂组合来施用本公开内容的药物组合物。例如,联合治疗可包括与至少一种其他抗炎剂或免疫抑制剂组合的本公开内容的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体。可用于联合治疗的治疗剂的实例在下文中关于本公开内容的抗体的用途的部分中进行更

详细地描述。

[0268] 如本文中所使用的,“可药用载体”包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。通常,载体适合用于静脉内、肌内、皮下、胃肠外、经脊柱或表皮施用(例如,通过注射或输注)。取决于施用的途径,可用材料包被活性化合物即抗体、其抗原结合部分、免疫缀合物或双特异性分子以保护化合物免受可使所述化合物失活的酸性和其他天然条件的作用。

[0269] 在某些实施方案中,本公开内容的抗体可以以中性形式(包括两性离子形式)或作为带正电荷或负电荷的类别存在。在一些情况下,可将抗体与抗衡离子复合以形成可药用的盐。因此,本公开内容的药物化合物包括一种或多种可药用的盐。

[0270] “可药用的盐”是指保持亲本化合物(例如抗体)的期望的生物学活性并且不提供不希望的毒理学效应的盐(参见例如,Berge, S. M., 等人(1977) J. Pharm. Sci. 66 :1-19)。例如,术语“可药用的盐”包括包含一种或多种抗体和一种或多种抗衡离子的复合物,其中抗衡离子来源于可药用的无机和有机酸及碱。

[0271] 此类盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括来源于无毒无机酸例如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等的盐,以及来自无毒有机酸例如脂肪族单和二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳香族酸、脂肪族和芳香族磺酸等的盐。碱加成盐包括来源于碱土金属例如钠、钾、镁、钙等的盐以及来自无毒有机胺例如 N, N' - 二苄基乙二胺、N- 甲基葡糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等的盐。

[0272] 此外,可药用的无机碱包括金属离子。金属离子包括但不限于合适的碱金属盐、碱土金属盐和其他生理可接受的金属离子。来源于无机碱的盐包括铝、铵、钙、钴、镍、钼、钒、锰、铬、硒、锡、铜、铁、亚铁(ferrous)、锂、镁、正锰盐(manganic salts)、亚锰(manganous)、钾、铷、钠和和锌,并且以它们通常的化合价存在。

[0273] 可从下列酸制备本公开内容的抗体的可药用的酸加成盐,所述酸包括但不限于,甲酸、乙酸、乙酰氨基苯甲酸、脂肪酸、抗坏血酸、硼酸、丙酸、苯甲酸、樟脑酸、碳酸、环拉酸、去氢胆酸、丙二酸、依地酸、乙基硫酸、芬地杵酸、偏磷酸、琥珀酸、羟基乙酸、葡萄糖酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、鞣酸、柠檬酸、硝酸、抗坏血酸、葡萄糖醛酸、马来酸、叶酸、富马酸、丙酸、丙酮酸、天门冬氨酸、谷氨酸、苯甲酸、盐酸、氢溴酸、氢碘酸、赖氨酸、异柠檬酸、三氟乙酸、扑酸(pamoic)、丙酸、邻氨基苯甲酸、甲磺酸(mesylic)、乳清酸、草酸、草酰乙酸、油酸、硬脂酸、水杨酸、氨基水杨酸、硅酸盐、对羟基苯甲酸、烟酸、苯乙酸、扁桃酸(mandelic)、双羟萘酸(embonic)、磺酸、甲磺酸、磷酸、膦酸、乙磺酸、乙二磺酸(ethanedisulfonic)、铵(ammonium)、苯磺酸、泛酸、萘磺酸、甲苯磺酸、2- 羟基乙磺酸、对氨基苯磺酸(sulfanilic)、硫酸、硝酸、亚硝酸、硫酸单甲酯、环己基氨基磺酸、 β - 羟基丁酸、甘氨酸、甘氨酸甘氨酸、谷氨酸、二甲基肿酸、二氨基己酸、樟脑磺酸、葡糖酸、硫氰酸、酮戊二酸、5- 磷酸吡哆醛、氯苯氧基乙酸、十一酸、N- 乙酰基-L- 天冬氨酸、半乳糖二酸和半乳糖醛酸。

[0274] 可药用的有机碱包括三甲胺、二乙胺、N, N' - 二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二苄胺、二乙醇胺、乙二胺、葡甲胺(N- 甲基葡糖胺)、普鲁卡因、环胺、季铵阳离子、精氨酸、甜菜碱、咖啡因、克立咪唑(clemizole)、2- 乙氨基乙醇、2- 二乙氨基乙醇、2- 二甲氨基乙醇、乙二胺、丁胺、乙醇胺、乙二胺、N- 乙基吗啉、N- 乙基哌啶、乙基葡糖胺、葡糖胺、氨基葡萄糖、组氨酸、hydrabamine、咪唑、异丙胺、甲基葡糖胺、吗啉、哌嗪、吡啶、吡哆辛、钆、哌啶、

聚胺树脂 (polyamine resin)、普鲁卡因、嘌呤、可可碱、三乙胺、三丙胺、三乙醇胺、氨基丁三醇、甲胺、牛磺酸、胆酸盐 / 酯 (cholate)、6-氨基-2-甲基-2-庚醇、2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇、2-氨基-2-甲基-1-丙醇、脂肪族单和二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳香族酸、脂肪族和芳香族磺酸、锍、三(羟甲基)甲基甘氨酸、胍、苯基环己胺、2-(N-吗啉代)乙磺酸、二(2-羟乙基)氨基-三(羟甲基)甲烷、N-(2-乙酰胺基)-2-氨基乙磺酸、1,4-哌嗪二乙磺酸、3-吗啉代-2-羟基丙磺酸、1,3-二[三(羟甲基)甲氨基]丙烷、4-吗啉丙磺酸、4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸、2-[(2-羟基-1,1-二(羟甲基)乙基)氨基]乙磺酸、N,N-二(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸、4-(N-吗啉代)丁磺酸、3-(N,N-二[2-羟乙基]氨基)-2-羟基丙磺酸、2-羟基-3-[三(羟甲基)甲氨基]-1-丙磺酸、4-(2-羟乙基)哌嗪-1-(2-羟基丙磺酸)、哌嗪-1,4-二(2-羟基丙磺酸)二水合物、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪丙磺酸、N,N-二(2-羟乙基)甘氨酸、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(4-丁磺酸)、N-[三(羟甲基)甲基]-3-氨基丙磺酸、N-三(羟甲基)甲基-4-氨基丁磺酸、N-(1,1-二甲基-2-羟乙基)-3-氨基-2-羟基丙磺酸、2-(环己基氨基)乙磺酸、3-(环己基氨基)-2-羟基-1-丙磺酸、3-(环己基氨基)-1-丙磺酸、N-(2-乙酰胺基)亚氨二乙酸、4-(环己基氨基)-1-丁磺酸、N-[三(羟甲基)甲基]甘氨酸、2-氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇和氨基丁三醇。

[0275] 本公开内容的药物组合物还可包括可药用的抗氧化剂。可药用的抗氧化剂的实例包括：(1) 水溶性抗氧化剂例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等；(2) 油溶性抗氧化剂例如棕榈酸抗坏血酸酯、丁羟茴醚 (BHA)、丁羟甲苯 (BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等；和 (3) 金属螯合剂例如柠檬酸、乙二胺四乙酸 (EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0276] 可用于本公开内容的药物组合物的合适的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等）和其合适的混合物、植物油例如橄榄油和可注射的有机酯例如油酸乙酯。可以例如通过使用包衣材料例如卵磷脂，在分散相的情况下通过维持所需颗粒大小，以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。

[0277] 此类组合物还可包含佐剂例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。可通过灭菌方法（同上）和通过包含各种抗菌剂和抗真菌剂例如，对羟苯甲酸、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸等来确保防止微生物的存在。还期望组合物包含等渗剂例如糖、氯化钠等。此外，可通过包含延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来产生可注射药物形式的延迟吸收。

[0278] 可药用的载体包括无菌水性溶液或分散体以及用于无菌可注射溶液或分散体的临时制备的无菌粉剂。用于药物活性物质的此类介质和试剂的用途在本领域内是已知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容，否则预期其在本公开内容的药物组合物中的用途。还可将增补的活性化合物整合入组合物。

[0279] 治疗性组合物在制造和贮存的条件通常必须是无菌和稳定的。可将组合物配制成溶液、微乳剂、脂质体或适合于高药物浓度的其他有序结构。载体可以是溶剂或分散介质，其包含例如水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等）和其合适的混合物。可以例如通过使用包衣材料例如卵磷脂，在分散体的情况下通过维持所需颗粒大小，以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。在许多情况下，优选在组合物中包含等渗剂例如糖、多元醇例如甘露醇、山梨醇或氯化钠。可通过在组合物中包含延迟吸收的试剂例如

单硬脂酸铝和明胶来产生可注射组合物的延迟吸收。

[0280] 可通过将活性化合物以所需的量与一种或组合的上文例举的成分（根据需要）在合适的溶剂中混合，然后进行无菌微过滤来制备无菌可注射溶液。通常，通过将活性化合物整合入无菌媒介物来制备分散体，所述无菌媒介物包含基本分散介质和来自上文例举的那些的所需的其它成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉剂的情况下，制备方法包括但不限于真空干燥和冷冻干燥（冻干），其产生活性成分和来自其之前无菌过滤的溶液的任何另外的期望的成分的粉剂。

[0281] 可与载体材料组合以产生单个剂型的活性成分的量将取决于待治疗的受试者和具体的施用模式。可与载体材料组合以产生单个剂型的活性成分的量通常是产生治疗效果的组合物的量。一般地，除了百分之百外，该量可在大约 0.01% 至大约 99% 的活性成分，优选大约 0.1% 至大约 70%，最优选大约 1% 至大约 30% 的活性成分（与可药用的载体组合）的范围内变化。

[0282] 调整给药方案以提供最佳的期望的响应（例如，治疗响应）。例如，可施用单次团注，可在一段时间内施用几个分份剂量，或根据治疗状况的紧迫性按比例减少或增加剂量。特别有利地以剂量单位形式配制胃肠外组合物以方便剂量的施用和一致性。剂量单位形式，如本文中所使用的，是指适合作为待治疗的受试者的单一剂量的物理上分开的单位；每一个单位包含经计算产生期望的治疗效果的预先确定量的活性成分和需要的药物载体。本公开内容的剂量单位形式的规格由下列确定并直接取决于下列：(a) 活性化合物的独特特征和要获得的特定治疗效果，和 (b) 配制这样的用于治疗个体中敏感性的活性化合物的工艺中固有的限制。

[0283] 关于抗体的施用，剂量在大约 0.0001 至 100mg/kg，更常见地 0.01 至 5mg/kg 的宿主体重的范围内变化。例如剂量可以是 0.3mg/kg 体重、1mg/kg 体重、3mg/kg 体重、5mg/kg 体重或 10mg/kg 体重或在 1 至 10mg/kg 的范围内。示例性治疗方案需要每周 1 次，每 2 周 1 次，每 3 周 1 次，每 4 周 1 次，每月 1 次，每 3 个月 1 次或每 3 至 6 个月 1 次施用。本公开内容的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体或其抗原结合部分的给药方案包括例如，1mg/kg 体重或 3mg/kg 体重（通过静脉内施用），对于给定的抗体，使用下列给药方案之一：(i) 每 4 周 1 次，进行 6 个剂量，然后每 3 个月 1 次；(ii) 每 3 周 1 次；(iii) 3mg/kg 体重 1 次，然后每 3 周 1 次 1mg/kg 体重。

[0284] 在一些方法中，同时施用具有不同结合特异性的 2 个或更多个单克隆抗体，在该情况下施用的各抗体的剂量落在指定的范围内。通常在多个场合施用抗体。单个剂量之间的间隔可以是例如，每周 1 次、每月 1 次、每 3 个月 1 次或每年 1 次。如通过测量患者中抗靶抗原的抗体的血液水平所显示的，间隔也可以是无规律的。在一些方法中，调整剂量以获得大约 1 至 1000 $\mu\text{g/ml}$ 的血浆抗体浓度和在一些方法中大约 25 至 300 $\mu\text{g/ml}$ 的血浆抗体浓度。

[0285] 备选地，可将抗体作为持续释放制剂施用，在该情况下需要较低的施用频率。剂量和频率取决于抗体在患者中的半衰期。一般地，人抗体显示最长的半衰期，然后是人源化抗体、嵌合抗体和非人抗体。施用的剂量和频率可视治疗是预防性的还是治疗性的而变化。在预防性应用中，在长时期内以相对低频率的间隔施用相对低的剂量。一些患者在他们的余生中持续接受治疗。在治疗性应用中，有时在相对短的间隔需要相对高的剂量直至疾病的

进展减慢或终止,优选直至患者显示疾病的症状部分或完全改善。之后,可给患者施用预防性方案。

[0286] 为了获得有效地实现对于特定患者、组合物和施用模式的期望的治疗响应而对患者无毒性的活性成分的量,本公开内容的药物组合物中活性成分的实际剂量水平可变化。选择的剂量水平将取决于许多药物动力学因素,包括使用的本公开内容的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性、施用途径、施用时间、使用的特定化合物的排泄速率、治疗的持续时间、与使用的特定组合物结合使用的其他药物、化合物和 / 或材料、待治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康和以前的医疗史等医学领域中熟知的因素。

[0287] 本公开内容的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的“治疗有效剂量”优选导致疾病症状的严重度的减轻、无疾病症状期的频率和持续时间的增加或由于疾病折磨而导致的削弱或失能的预防。例如,关于 $\alpha 5 \beta 1$ 阳性肿瘤的治疗,相对于未治疗的受试者,“治疗有效剂量”优选抑制细胞生长或肿瘤生长达至少大约 20%,更优选至少大约 40%,更优选至少大约 60% 和更优选至少大约 80%。可在预测人肿瘤中的功效的动物模型系统中评估化合物抑制肿瘤生长的能力。备选地,组合物的该性质可通过利用本领域技术人员已知的测定法体外检查化合物抑制的能力来进行评估。治疗性化合物的治疗有效量可减小受试者中的肿瘤大小或改善症状。本领域技术人员将能够基于这样的因素如受试者的尺寸、受试者的症状的严重程度以及选择的特定组合物或施用途径来确定这样的量。

[0288] 可使用本领域内已知的许多方法中的一个或多个,经由一个或多个施用途径施用本公开内容的组合物。如本领域技术人员所理解的,施用途径和 / 或模式将取决于期望的结果。用于本公开内容的抗体或其抗原结合部分的施用途径包括静脉内、肌肉内、真皮内、腹膜内、皮下、经脊柱或其他胃肠外施用途径(例如通过注射或输注)。短语“胃肠外施用”,如本文中所使用的,是指除了经肠和局部施用外的施用模式(通常通过注射),并且包括但不限于,静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心脏内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜上和胸骨内注射和输注。

[0289] 备选地,可通过非胃肠外途径例如局部、表皮或粘膜施用途径,例如鼻内、口服、经阴道、经直肠、舌下或局部地施用本公开内容的抗体或其抗原结合部分。

[0290] 可用保护化合物免受快速释放的载体来制备活性化合物,例如控制释放制剂,包括埋植剂、透皮贴片和微型胶囊递送系统。可使用可生物降解的生物相容性聚合物例如乙炔乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、多正酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的许多方法已取得专利或通常对于本领域技术人员来说是已知的。参见,例如, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0291] 可用本领域内已知的医疗装置施用治疗性组合物。例如,可用无针皮下注射装置例如美国专利 5,399,163 ;5,383,851 ;5,312,335 ;5,064,413 ;4,941,880 ;4,790,824 或 4,596,556 中公开的装置施用本公开内容的治疗性组合物。可用于本公开内容的熟知的埋植剂和组件(module)的实例包括:美国专利 4,487,603,其公开了用于以受控的速率分配药物的可植入微量输注泵;美国专利 4,486,194,其公开了用于通过皮肤施用药剂的治疗性装置;美国专利 4,447,233,其公开了用于以精确的输注速率递送药剂的药剂输注泵;美国专利 4,447,224,其公开了用于连续药物递送的流速可变的可植入输注装置;美国专利

4,439,196,其公开了具有多个区室的渗透药物递送系统;和美国专利 4,475,196,其公开了渗透药物递送系统。许多其他此类埋植剂、递送系统和组件对于本领域技术人员来说是已知的。

[0292] 在某些情况下,可配制本公开内容的人单克隆抗体或其抗原结合部分以确保合适的体内分配。例如,血脑屏障(BBB)排除许多高度亲水的化合物。为了确保本公开内容的治疗性化合物穿过BBB(需要时),可将它们配制在例如脂质体中。关于制备脂质体的方法,参见,例如,美国专利 4,522,811;5,374,548和 5,399,331。脂质体可包含一个或多个部分,其被选择性转运入特定细胞或器官从而增强靶向药物递送(参见,例如,V. V. Ranade(1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685)。示例性靶向部分包括叶酸或生物素(参见,例如,属于 Low 等人的美国专利 5,416,016);甘露糖苷(Umezawa 等人,(1988)Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038);抗体(P. G. Bloeman 等人(1995)FEBS Lett. 357:140;M. Owais 等人(1995)Antimicrob. Agents Chemother. 39:180);表面活性剂蛋白 A 受体(Briscoe 等人(1995)Am. J. Physiol. 1233:134);p120(Schreier 等人(1994)J. Biol. Chem. 269:9090);也参见 K. Keinänen;M. L. Laukkanen(1994)FEBS Lett. 346:123;J. J. Killian;I. J. Fidler(1994;Immunomethods 4:273)。

[0293] 本公开内容的用途和方法

[0294] 本公开内容的抗体,特别地人抗体、抗体组合物和方法具有许多体外和体内诊断性和治疗性用途,包括 $\alpha 5 \beta 1$ 介导的病症的诊断和治疗。例如,可体外或离体地给培养中的细胞或例如体内给人受试者施用此类分子以治疗、预防和诊断众多的病症。如本文中所使用的,术语“受试者”意在包括人和非人动物。非人动物包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、牛、马、鸡、两栖动物和爬行动物。优选的受试者包括患有由 $\alpha 5 \beta 1$ 活性介导的病症的人患者。所述方法特别适合用于治疗患有与异常 $\alpha 5 \beta 1$ 表达相关的病症的人患者。当将抗 $\alpha 5 \beta 1$ 的抗体与另一种试剂一起施用,可以顺序地或同时地施用两种试剂。

[0295] 鉴于本公开内容的抗体对 $\alpha 5 \beta 1$ 的特异性结合,本公开内容的抗体可用于特异性检测细胞表面上的 $\alpha 5 \beta 1$ 表达和此外,可用于通过免疫亲和层析纯化 $\alpha 5 \beta 1$ 。

[0296] 此外,鉴于 $\alpha 5 \beta 1$ 在多种肿瘤细胞上表达(参见,例如实施例 6,图 7),和其参与血管生成,本公开内容的人抗体、抗体组合物和方法可用于治疗具有异常细胞生长,例如特征在于表达 $\alpha 5 \beta 1$ 的肿瘤细胞的存在病症的受试者,所述病症包括,例如,间皮瘤、肝胆管(肝和胆管)肿瘤、原发性或继发性 CNS 肿瘤、原发性或继发性脑肿瘤、肺癌(NSCLC 和 SCLC)、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤黑素瘤或眼内黑素瘤、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肛门区域癌、胃癌、胃肠道(胃、结直肠和十二指肠)癌、乳腺癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、何杰金氏病、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、睾丸癌、慢性或急性白血病、慢性髓性白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性 CNS 淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、脊轴肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、肾上腺皮质癌、胆囊癌、多发性骨髓瘤、胆管癌、纤维肉瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤或一种或多种上述癌症的组合。

[0297] 在一种情况下,本公开内容的抗体(例如,人单克隆抗体、多特异性和双特异性

分子和组合物)或其抗原结合部分可用于检测 $\alpha 5 \beta 1$ 的水平或在它们的膜表面上含有 $\alpha 5 \beta 1$ 的细胞的水平,然后可将该水平与某些疾病症状相关联。备选地,抗体可用于抑制或阻断 $\alpha 5 \beta 1$ 功能,反过来可将这与某些疾病症状的预防或改善相关联,从而暗示 $\alpha 5 \beta 1$ 可作为疾病的介体 (mediator)。这可通过在允许抗体与 $\alpha 5 \beta 1$ 之间形成复合物的条件下将样品和对照样品与抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体接触来获得。检测和比较样品和对照中抗体与 $\alpha 5 \beta 1$ 之间形成的任何复合物。

[0298] 在另一种情况下,就与治疗或诊断用途相关的结合活性在体外初步测试本公开内容的抗体(例如,人抗体、多特异性和双特异性分子和组合物)或其抗原结合部分。例如,可使用下面实施例中描述的流式细胞测定法测试本公开内容的组合物。

[0299] 本公开内容的抗体(例如,人抗体、多特异性和双特异性分子、免疫缀合物和组合物)或其抗原结合部分在 $\alpha 5 \beta 1$ 相关疾病的治疗和诊断中具有额外的功用。例如,人单克隆抗体、多特异性或双特异性分子和免疫缀合物可用于体内或体外引发一种或多种下列生物学活性:抑制表达 $\alpha 5 \beta 1$ 的细胞的生长和/或杀死所述细胞;在人效应细胞存在的情况下介导表达 $\alpha 5 \beta 1$ 的细胞的吞噬作用或 ADCC,或阻断 $\alpha 5 \beta 1$ 配体对 $\alpha 5 \beta 1$ 的结合。

[0300] 在特定的情况下,在体内使用抗体(例如,人抗体、多特异性和双特异性分子和组合物)或其抗原结合部分治疗、预防或诊断众多种 $\alpha 5 \beta 1$ 相关疾病。 $\alpha 5 \beta 1$ 相关疾病的实例,特别地,包括异常细胞生长例如癌症。在一个实施方案中,异常细胞生长是癌症,包括,但不限于,间皮瘤、肝胆管(肝和胆管)肿瘤、原发性或继发性 CNS 肿瘤、原发性或继发性脑肿瘤、肺癌(NSCLC 和 SCLC)、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤黑素瘤或眼内黑素瘤、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肛门区域癌、胃癌、胃肠道(胃、结直肠和十二指肠)肿瘤、乳腺癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、何杰金氏病、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、睾丸癌、慢性或急性白血病、慢性髓性白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性 CNS 淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、脊轴肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、肾上腺皮质癌、胆囊癌、多发性骨髓瘤、胆管癌、纤维肉瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤或一种或多种上述癌症的组合。

[0301] 体内和体外施用本公开内容的抗体组合物(例如,人单克隆抗体,多特异性和双特异性分子和免疫缀合物)或其抗原结合部分的合适途径在本领域内是熟知的并且可由本领域技术人员选择。例如,可通过注射(例如,静脉内或皮下)施用抗体组合物。使用的分子的合适剂量将取决于受试者的年龄和体重以及抗体组合物的浓度和/或制剂。

[0302] 如之前所描述的,可将本公开内容的人抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体或其抗原结合部分与一种或多种其他治疗剂例如细胞毒性剂、放射性毒性剂或免疫抑制剂共施用。可将抗体连接至试剂(作为免疫复合物)或与试剂分开施用。在后一种情况下(分开施用),抗体可在试剂之前、之后施用,或与试剂同时施用,或可与其他已知的疗法例如抗癌疗法例如辐照一起共施用。此类治疗剂包括,特别地,抗肿瘤剂例如多柔比星(阿霉素)、顺铂、硫酸博来霉素、卡莫司汀、苯丁酸氮芥和环磷酰胺羟基脲(此类试剂,就它们本身而言,只有在对患者是毒性或亚毒性的水平上才有效)。可以每 4 周 1 次以 100mg/ 剂量静脉内施用顺铂和每 21 天 1 次以 60 至 75mg/ml 剂量静脉内施用阿霉素。本公开内容的人抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体或其抗原结合片段与化疗剂的共施用提供了通过不同机制(其对人肿瘤细胞产生细胞毒性效应)起作

用的两种抗癌剂。这样的共施用可解决由于对药物的抗性的发展或肿瘤细胞的抗原性的变化（这可使它们不与抗体反应）而导致的问题。

[0303] 本公开内容的靶特异性效应细胞，例如，连接至组合物（例如，人抗体、多特异性和双特异性分子）的效应细胞还可用作治疗剂。用于靶向的效应细胞可以是人白细胞例如巨噬细胞、嗜中性粒细胞或单核细胞。其他细胞包括嗜酸性粒细胞、天然杀伤细胞和其他具有 IgG- 或 IgA- 受体的细胞。需要时，可从待治疗的受试者获得效应细胞。可以以细胞悬浮液（在生理上可接受的溶液中）的形式施用靶特异性效应细胞。施用的细胞的数目可以是 10^8 至 10^9 的量级但取决于治疗目的。一般地，该量将足以在靶细胞例如表达 $\alpha 5 \beta 1$ 的肿瘤细胞上获得定位并且通过例如吞噬作用实现细胞杀伤。施用途径也可变化。

[0304] 可结合用于除去被靶向的细胞的其他技术进行使用靶特异性效应细胞的治疗。例如，将使用本公开内容的组合物（例如，人抗体、多特异性和双特异性分子）的抗肿瘤疗法和 / 或配备有此类组合物的效应细胞与化学疗法结合使用。此外，可将联合免疫疗法用于将两种不同的细胞毒性效应子群体导向肿瘤细胞排斥。例如，可将连接至抗 Fc- γ RI 或抗 CD3 的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体与 IgG- 或 IgA- 受体特异性结合剂结合使用。

[0305] 本公开内容的双特异性和多特异性分子还可用于调节 Fc γ R 或效应细胞上的 Fc γ R 水平，例如通过对细胞表面上的受体进行加帽（capping）或清除所述受体。抗 Fc 受体的混合物也可用于该目的。

[0306] 还可在补体存在的情况下使用具有补体结合部位（例如来自结合补体的 IgG1、-2 或 -3 或 IgM 的部分）的本公开内容的组合物（例如，人、人源化或嵌合抗体、多特异性和双特异性分子和免疫缀合物）。在一种情况下，可通过加入补体或含有补体的血清来补充包含具有本公开内容的结合剂的靶细胞和合适的效应细胞的细胞群体的离体治疗。可通过结合补体蛋白提高用本公开内容的结合剂包被的靶细胞的吞噬作用。在另一种情况下，还可利用补体裂解用本公开内容的组合物（例如，人抗体、多特异性和双特异性分子）包被的靶细胞。在另一种情况下，本公开内容的组合物不激活补体。

[0307] 还可将本公开内容的组合物（例如，人、人源化或嵌合抗体、多特异性和双特异性分子和免疫缀合物）与补体一起施用。因此，在本公开内容的范围内的是包含人抗体、多特异性或双特异性分子以及血清或补体的组合物。此类组合物是有利的，因为补体位于人抗体、多特异性或双特异性分子的邻近。备选地，可分开施用本公开内容的人抗体、多特异性或双特异性分子以及补体或血清。

[0308] 也在本公开内容的范围内的是包括本公开内容的抗体组合物（例如，人抗体、双特异性或多特异性分子或免疫缀合物）和使用说明书的试剂盒。试剂盒还可包含一种或多种额外的试剂例如免疫抑制剂、细胞毒性剂或放射性毒性剂或本公开内容的一种或多种另外的人抗体或其抗原结合部分（例如，具有补体活性的人抗体，其结合与第一人抗体不同的 $\alpha 5 \beta 1$ 抗原中的表位）。

[0309] 因此，可对使用本公开内容的抗体组合物进行治疗的患者额外地施用（在施用本公开内容的人抗体之前、同时或之后）增强或提高人抗体的治疗效果的另一种治疗剂，例如细胞毒性剂或放射性毒性剂。

[0310] 在其他情况下，可以通过例如，用细胞因子治疗受试者来用调节例如增强或抑制 Fc γ 或 Fc γ 受体的表达或活性的试剂额外地治疗受试者。在使用多特异性分子的治疗过

程中,可施用的细胞因子包括粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素- γ (IFN- γ)和肿瘤坏死因子(TNF)。

[0311] 还可使用本公开内容的组合物(例如,人抗体、多特异性和双特异性分子)靶向表达Fc γ R或 α 5 β 1的细胞,例如以标记此类细胞。为了该用途,可将结合剂连接至能够被检测的分子。因此,本公开内容提供了离体或体外定位表达Fc受体例如Fc γ R或 α 5 β 1的细胞的方法。可检测的标记可以是例如放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子。

[0312] 在特定的情况下,本公开内容提供了用于检测 α 5 β 1抗原在样品中的存在或测量 α 5 β 1抗原的量的方法,其包括在允许抗体或其部分与 α 5 β 1之间形成复合物的条件下将样品和对照样品与特异性结合 α 5 β 1的人单克隆抗体或其抗原结合部分接触。然后检测复合物的形成,其中与对照样品相比,样品之间的不同的复合物形成表示 α 5 β 1抗原存在于样品中。

[0313] 在其他情况下,本公开内容提供了通过给受试者施用上述人抗体或其抗原结合部分来治疗受试者中 α 5 β 1介导的病症,例如异常细胞生长例如癌症的方法。此类抗体和其衍生物用于抑制 α 5 β 1诱导的与某些病症相关的活性,例如,血管生成、增殖和分化。通过将抗体与 α 5 β 1接触(例如,通过给受试者施用抗体), α 5 β 1诱导此类活性的能力被抑制,从而相关的病症得到治疗。可将抗体组合物单独地或与另一种治疗剂例如细胞毒性剂或放射性毒性剂一起施用,所述治疗剂与抗体组合物一起或协同地起作用以治疗或预防 α 5 β 1介导的疾病。

[0314] 在另一种情况下,本公开内容的免疫缀合物可用于通过将化合物连接至抗体来将这样的化合物(例如,治疗剂、标记、细胞毒素、放射性毒素、免疫抑制剂等)靶向具有 α 5 β 1细胞表面受体的细胞。因此,本公开内容还提供了离体或体内定位表达 α 5 β 1的细胞的方法(例如,使用可检测的标记例如放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子)。备选地,免疫缀合物可用于通过将细胞毒素或放射性毒素靶向 α 5 β 1来杀死具有 α 5 β 1细胞表面受体的细胞。

[0315] 本公开内容进一步通过下列不应当解释为进一步限定的实施例来举例说明。在整个本公开内容中引用的所有图和所有参考资料、专利和公开的专利申请的内容明确地以其全文通过引用合并入本文。

实施例

[0316] 实施例1:产生抗 α 5 β 1抗体的杂交瘤的产生

[0317] 如下制备、选择和测定根据本公开内容的举例说明性抗体:

[0318] 免疫和杂交瘤的产生:

[0319] 将下列免疫原用于杂交瘤的产生:纯化的重组人整联蛋白- α 5蛋白-Fc;整联蛋白- α 5-His(R&D Systems, custom order);经转染表达人 α 5的NIH3T3细胞;天然地表达人整联蛋白 α 5 β 1的Jurkat细胞系、U-937细胞系(ATCC Cat No CRL-1593)和K-562细胞系(ATCC Cat No CCL-243)。

[0320] 纯化的重组人整联蛋白- α 5蛋白-Fc是融合至大鼠Fc结构域的人整联蛋白 α 5的细胞外结构域(氨基酸42-995)的嵌合构建体,其被克隆入pSecTag2载体并且使用293-FreeStyle系统(Invitrogen)进行表达。如下产生经转染表达人 α 5的NIH3T3细胞。

从全长人整联蛋白 $\alpha 5$ MGC 克隆 (Invitrogen) 克隆全长人整联蛋白 $\alpha 5$ cDNA (Invitrogen, Cat. No. FL 1002, 克隆 ID :3629647) 并且将其亚克隆入逆转录病毒表达载体 (pBabe)。产生病毒颗粒并且将其用于感染 NIH3T3 细胞 (ATCC Cat No CRL-1658)。加入嘌呤霉素以选择阳性稳定细胞克隆。进行人 $\alpha 5$ 蛋白表达的 Western 印迹和 FACS 分析以挑选高表达稳定细胞克隆。

[0321] 使用人 Ig 转基因小鼠品系 Hco7/Hco12 以及人转染色体 / 转基因品系, KM (Medarex, Inc.) 制备抗人整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 的全长人单克隆抗体。此类品系都表达不能与从人分离的抗体相区别的完全人抗体。在此类小鼠品系中, 已如 Chen 等人 (1993) EMBO J. 12 :811-820 中所述对内源小鼠 κ 轻链基因进行了纯合破坏, 并且已如 PCT 公开案 W001/09187 的实施例 1 中所述对内源小鼠重链基因进行了纯合破坏。此类小鼠品系的每一个都携带人 κ 轻链转基因 KCo5, 如 Fishwild 等人 (1996) Nature Biotechnology 14 :845-851 中所描述的。HCo7 品系具有 HCo7 人重链转基因, 如美国专利 5,545,806、5,625,825 和 5,545,807 中所描述的。HCo12 品系具有 HCo12 人重链转基因, 如 PCT 公开案 W0 01/09187 的实施例 2 中所描述的。HCo7/Hco12 品系具有 HCo7 和 HCo12 重链转基因。KM 品系具有人微型染色体, 如 Ishida 等人, (2002), Cloning and Stem Cells, 4 :91-102 中所描述的。

[0322] 为了产生抗 $\alpha 5 \beta 1$ 的完全人单克隆抗体, 用重组人整联蛋白 - $\alpha 5$ 蛋白 -Fc 或整联蛋白 - $\alpha 5$ -His、经转染表达人 $\alpha 5$ 的 NIH3T3 细胞和天然表达人 $\alpha 5 \beta 1$ 的 Jurkat 细胞系、U-937 细胞系和 K-562 细胞系免疫 Hco7/Hco12 和 KM 品系的 HuMab 小鼠。用于 HuMab 小鼠的一般免疫方案描述于 Lonberg, N, 等人 (1994) Nature 368 (6474) :856-859 ; Fishwild, D. 等人 (1996) Nature Biotechnology 14 :845-851 和 PCT 公开案 W0 98/24884 中。在第一次抗原输注时小鼠为 6-16 周龄。将人整联蛋白 - $\alpha 5$ 蛋白 -Fc 或整联蛋白 - $\alpha 5$ -his 抗原的纯化的重组制备物 (15-20 μ g)、经转染的 NIH3T3 细胞或 Jurkat 细胞、U-937 细胞和 K-562 细胞 (1×10^7 个细胞) 的制备物用于腹膜内 (IP) 和皮下 (Sc) 免疫 HuMab 小鼠。

[0323] 以 1 至 4 周的间隔 (直至总共 16 次免疫) 用 Ribi 佐剂中的抗原腹膜内和皮下免疫转基因小鼠。在通过眶后放血采集的血液中监控免疫应答。利用 FACS 筛查血清 (如下所述), 将具有足够滴度的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 人免疫球蛋白的小鼠用于融合。在杀死并且取出脾脏和 / 或淋巴结之前 3 和 2 天用抗原静脉内加强免疫小鼠。通常, 对于每一个抗原进行 10 至 20 个融合。免疫总共 60 只 Hco7/Hco12 和 KM 小鼠。对于每一种抗原免疫数打小鼠。

[0324] 产生抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的 HuMab 小鼠的选择:

[0325] 为了选择产生结合 $\alpha 5 \beta 1$ 的抗体的 HuMab 小鼠, 利用流式细胞术 (FACS) 就与表达全长人 $\alpha 5 \beta 1$ 的细胞系结合但不与不表达 $\alpha 5 \beta 1$ 的对照细胞系结合筛选经免疫的小鼠的血清。简而言之, 将表达 $\alpha 5$ 的 NIH3T3 细胞与以 1 : 20 稀释的经免疫的小鼠的血清一起温育。清洗细胞, 使用 FITC- 标记的抗人 IgG Ab 检测特异性抗体结合。在 FACS 流式细胞仪 (Becton Dickinson, San Jose, CA) 上进行流式细胞术分析。将产生最高滴度的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的小鼠用于融合。如下所述进行融合, 通过 FACS 就抗 $\alpha 5 \beta 1$ 活性测试杂交瘤上清液。

[0326] 产生抗 $\alpha 5 \beta 1$ 的人单克隆抗体的杂交瘤的产生:

[0327] 利用厂商推荐的方案, 使用电融合 (E- 融合, Cyto Pulse™ technology, Cyto Pulse™ Sciences, Inc., Glen Burnie, MD) 将从 HuMab 小鼠分离的小鼠脾细胞和 / 或淋巴结

淋巴细胞融合至小鼠骨髓瘤细胞系 Sp2/0 (ATCC, CRL-1581, Manassas, VA)。简而言之,使用 E- 融合将来自经免疫的小鼠的脾和 / 或淋巴结淋巴细胞的单细胞悬浮物与等数量的 Sp2/0 非分泌型小鼠骨髓瘤细胞融合。将细胞以大约 2×10^4 个脾细胞 / 孔涂板在平底微量滴定板中,然后在选择培养基 (其包含 10% 胎牛血清、10% P388D1 (ATCC, CRL-TIB-63) 条件化培养基、在具有高葡萄糖、L- 谷氨酰胺和丙酮酸钠的 DMEM (Mediatech, Herndon, VA, Cat. No, CRL 10013) 中的 3 至 5% (IGEN)、5mM HEPES、0.055mM 2- 巯基乙醇、50mg/ml 庆大霉素和 1xHAT (Sigma, Cat. No. CRL-P-7185)) 中温育 10 至 14 天。在 1 至 2 周后,将细胞培养在其中用 HT 替代 HAT 的培养基中。在细胞涂板后大约 10 至 14 天,首先就它们是否含有人 γ 、 κ 抗体筛选来自单个孔的上清液。然后利用 FACS (如上所述的) 就人抗 $\alpha 5 \beta 1$ 筛选对于人 γ 、 κ 评分为阳性的上清液。

[0328] 单克隆 IgG 抗体:

[0329] 将抗体分泌型杂交瘤转移至 24 孔板,再次进行筛选,并且如果对于人抗 $\alpha 5 \beta 1$ IgG 单克隆抗体确认为阳性,则通过有限稀释将其亚克隆至少 2 次。然后体外培养稳定的亚克隆以在组织培养基中产生少量抗体用于进一步表征。上述方法用于产生数种抗 $\alpha 5 \beta 1$ 单克隆抗体,包括本文中描述的称为“22B5”、“24C7”、“1D9”和“2D2”的抗体。

[0330] 实施例 2: 人单克隆抗体 22B5 的结构特征

[0331] 使用标准 PCR 技术从 22B5 杂交瘤获得编码 22B5 单克隆抗体的重链和轻链可变区的 cDNA 序列,然后使用标准 DNA 测序技术进行测序。

[0332] 22B5 的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别示于图 1A 和 1B 中以及 SEQ ID NO: 11 和 7 中。22B5 的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别示于图 1C 和 1D 中以及 SEQ ID NO: 12 和 8 中。

[0333] 原始 22B5 分子的亚类为 IgG4。将 IgG 亚类转换成 IgG1 以提供 Fc γ R 结合和效应子功能例如 ADCC。通过定点诱变将 3 个突变导入 IgG1 恒定区 (S247D、A338L 和 I340E) 以进一步增加对 Fc γ R 的结合和效应子功能活性。具有 IgG1 亚类且包含这 3 个突变的 22B5 称为“22B5/DLE”或“22B5 IgG1 DLE”。将重链可变结构域的 2 个突变回复至种系以使免疫原性最小 (I30S 和 N33S)。在轻链可变序列中未发现突变。22B5/DLE 的重链示为 SEQ ID NO: 9, 而 22B5/DLE 的轻链示为 SEQ ID NO: 10。

[0334] 22B5 重链免疫球蛋白序列与已知的人种系免疫球蛋白重链序列的比较显示, 22B5 重链利用来自人种系 V_H 4-39 的 V_H 区段、来自人种系 3-10 的 D 区段和来自人种系 JH 6b 的 JH 区段。22B5 V_H 序列与种系 V_H 4-39 序列的比对示于图 2 中。使用确定 CDR 区的 Kabat 系统对 22B5 V_H 序列的进一步分析导致重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区 (如图 1B 中所示以及分别示于 SEQ ID NO: 1、2 和 3 中) 的确定。

[0335] 22B5 轻链免疫球蛋白序列与已知的人种系免疫球蛋白轻链序列的比较显示, 22B5 轻链利用来自人种系 V_L L6 的 V_L 区段和来自人种系 JK4 的 JK 区段。22B5 V_L 序列与种系 V_L L6 序列的比对示于图 2 中。使用确定 CDR 区的 Kabat 系统对 22B5 V_L 序列的进一步分析导致轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区 (如图 1D 中所示以及分别示于 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中) 的确定。

[0336] 实施例 3: 人单克隆抗体 22B5 的结合特异性和结合动力学的表征

[0337] 在本实施例中, 通过 Biacore 分析检查具有 IgG1 DLE 突变的 22B5 人抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗

体 (22B5/DLE) 的结合亲和力和结合动力学。此外,利用流式细胞术 (FACS) 检查结合特异性。

[0338] 结合亲和力和动力学

[0339] 使用 Biacore 分析 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) 测定 22B5/DLE 对 $\alpha 5 \beta 1$ 的细胞外结构域的结合动力学和额定亲合力 (nominal avidity)。为了进行 BIACore 动力学分析,将 22B5/DLE 抗体固定在生物传感器芯片上,然后在 25.0°C 下将不同浓度的人重组 $\alpha 5 \beta 1$ 细胞外结构域流过表面 (参见图 3)。将结合数据全局拟合至简单的一对一结合模型 (具有漂移基线 (drifting baseline))。22B5/DLE 可逆地结合 $\alpha 5 \beta 1$ 。对人重组 $\alpha 5 \beta 1$ 细胞外结构域的结合常数 (K_D) 在 2.7 至 4.1nM 之间。当在二价阳离子不存在的情况下测量时 K_D 更大,这与整联蛋白的阳离子依赖性激活一致。动力学结合参数在 3.4×10^{-5} 至 $4.5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 之间 (对于结合速率) 和 1.2×10^{-3} 至 $1.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 之间 (对于解离速率) (参见图 3 和表 1)。

[0340] 为了获得额定亲合力测量值,将人重组 $\alpha 5 \beta 1$ 细胞外结构域固定在生物传感器芯片上,在 25.0°C 下使不同浓度的 22B5/DLE 流过表面。额定亲合力值估计为 0.05pM (于 20mM HEPES pH7.4, 150mM NaCl, 0.005% P20 和 4.0mM MgCl_2 中)。

[0341] 表 1:根据 BIACore 研究获得的结合和动力学数据的概述

[0342]

22B5/DLE 对于 $\alpha 5 \beta 1$ 的亲合力 (Biacore)	
K_D (CaCl_2)	2.7 nM
K_D (MgCl_2)	4.1 nM
结合速率 (k_{on}) (CaCl_2)	$4.5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
结合速率 (k_{on}) (MgCl_2)	$3.4 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
解离速率 (k_{off}) (CaCl_2)	$1.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
解离速率 (k_{off}) (MgCl_2)	$1.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
22B5/DLE 对于 $\alpha 5 \beta 1$ 的亲合力 (K_D , Biacore)	0.05pM

[0343] CaCl_2 是指具有 4.0mM CaCl_2 的 10mM HEPES pH7.4, 150mM NaCl, 0.005% P20 的缓冲条件; MgCl_2 是指具有 4.0mM MgCl_2 的 10mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 0.005% P20 的缓冲条件。

[0344] 通过 FACS 测定的对于 $\alpha 5 \beta 1$ 的细胞亲和力

[0345] 使用 FACS 测定,利用表达内源人整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 的细胞 (HUVEC),就 22B5/DLE 抗体对细胞表面整联蛋白 $\alpha 5$ 的结合亲合力测试 22B5/DLE 抗体。简而言之,使用胰蛋白酶-EDTA 使细胞分离,并用冷 PBS 清洗细胞。在等分入 96 孔板后,用血清封闭细胞,然后将其与不同浓度的特异性 mAb 在 4°C 下温育 1 小时。随后,清洗细胞,将其与缀合有 R-PE 荧光团的抗人 κ 二抗一起温育,然后使用 FACSCalibur 流式细胞仪进行分析。对于每一个样品收集 10,000 个事件而不使用任何门控 (gating)。为了进行 K_D 测定,计算各样品直方图的几何平均值,将其作为 mAb 浓度的函数作图。在拟合至两态平衡模型 (two-state equilibrium model) 后计算 K_D 。22B5/DLE 在 HUVEC 中以 2.15nM 的 K_D ($n = 4$) 结合内源性 $\alpha 5 \beta 1$ (参见图 4)。

[0346] 实施例 4:通过 Biacore 测量的对 $\text{Fc}\gamma$ 受体的亲和力

[0347] 在Biacore结合实验中评估包含IgG1 DLE三突变(如之前在实施例2中论述的)的22B5/DLE增强对Fc γ R的结合的能力。将22B5/DLE的Fc γ R结合亲和力与野生型(wt)IgG1的结合亲和力相比较。测试的Fc γ R的三个类型是:1)高亲和力受体Fc γ RI;2)低亲和力受体的两个多态性变体Fc γ RIIa/131H和Fc γ RIIa/131R;和3)中等亲和力受体的两个多态性变体Fc γ RIIIa/158F和Fc γ RIIIa/158V。结果(示于图5中,和概述于表2中)显示对于高亲和力受体Fc γ RI大约6倍的增加。对于与中等亲和力受体Fc γ RIII/158F和158V的结合,分别观察到122和70倍的增强。也评估22B5/DLE和野生型IgG1对鼠Fc γ 受体的结合亲和力比较。结合的最大增强是与mFc γ RIV的结合,然后与mFc γ RI和mFc γ RIII的结合(参见图5)。

[0348] 表2:对Fc γ R的Biacore结合(K_D ,超过wt IgG1的倍数增强)

[0349]

Fc γ R	K_D (超过wt IgG1的倍数增强)
人Fc γ RI	5.8nM(6X)
人Fc γ RIIa/131H	1000nM(1.6X)
人Fc γ RIIa/131R	650nM(2.3X)
人Fc γ RIII/158F	27nM(122X)
人Fc γ RIII/158V	9.4nM(70X)
鼠Fc γ RI	96nM(14X)
鼠Fc γ RIII	1700nM(5X)
鼠Fc γ RIV	9.1nM(260X)

[0350] 实施例5:22B5/DLE的细胞功能活性

[0351] 细胞附着阻断

[0352] 测试22B5/DLE中断整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 介导的细胞附着的能力。通过将HUVEC细胞与抗体(22B5/DLE、22B5 IgG1、IgG2和IgG4亚类变体或阴性对照mAb(BHA2 IgG1))一起预温育,然后将其涂板在纤连蛋白(FN)或胶原包被的板上来进行细胞附着测定。将HUVEC细胞(15,000个)与抗体在附着缓冲液(adhesion buffer)(含有葡萄糖和牛血清白蛋白的Hepes缓冲的盐溶液)中于室温下混合20分钟。向用纤连蛋白或胶原包被的96孔板的孔中加入细胞,让其在37°C/5% CO₂下附着至板进行1小时。通过清洗各孔3次除去未附着的细胞。测量保留在各孔中的附着细胞的量。通过加入含有CyQUANT GR染料的缓冲液来裂解附着细胞,使用板读出器(plate reader)在Ex/Em:485/535nm处测量荧光。如可在图6中看到的,功能阻断性整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ mAb选择性抑制HUVEC至纤连蛋白但非至胶原(阴性对照)的附着。如图6中所示的,22B5/DLE和其亚类变体(野生型IgG1、IgG1 DLE、IgG2和IgG4)的IC₅₀在该1小时的测定中相似。这些数据证明,抗体与 $\alpha 5$ 和/或 $\alpha 5 \beta 1$

的结合抑制整联蛋白与纤连蛋白的结合。这些数据进一步表明,当 $\alpha 5 \beta 1$ 在细胞表面上表达时抗体结合 $\alpha 5 \beta 1$ 。即,当 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 链结合时,被抗体识别的表位是可获得的,当整联蛋白在细胞表面上表达时,表位可获得用于结合。

[0353] 实施例 6:体外 ADCC 效应子功能

[0354] 使用标准方法在抗 $\alpha 5 \beta 1$ - 阳性靶细胞的人外周血单核细胞 (PBMC) 存在的情况下通过 ADCC 测定评估效应子功能活性。如下通过 Western 印迹分析测量众多细胞系的整联蛋白 $\alpha 5$ 的表达水平。在含有蛋白酶 (Roche) 和磷酸酶抑制剂 (Calbiochem) 的 RIPA 裂解缓冲液 (Upstate) 中裂解细胞。将裂解物 (各 $3 \mu\text{g}$ 的总蛋白) 在 SDS-PAGE 凝胶上电泳,然后用抗整联蛋白 $\alpha 5$ 抗体进行免疫印迹。利用来自 LI-COR Bioscience 的 Odyssey 红外成像系统鉴定和分析免疫反应性条带。表达范围的实例示于图 7 中。

[0355] 为了测量 ADCC,按照标准方法,使用 Ficoll 梯度离心从 San Diego 血库样品中分离效应细胞 (PBMC)。将 1 万个靶细胞 (HUVEC 或肿瘤细胞系) 在室温下与抗体一起在生长培养基中预温育 20 分钟,然后加入 1 百万个人 PBMC (E : T = 100 : 1),将混合物在 37°C /5% CO_2 下温育 4 小时。按照标准方案,使用乳酸脱氢酶 (LDH) 释放检测 (Roche) 或 ToxiLight BioAssay 试剂盒 (Cambrex) 测量 ADCC 介导的细胞裂解。

[0356] 22B5/DLE 结合肿瘤或内皮表达的整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 并且与对于 wt22B5 IgG1 的 0.23nM 相比,以 0.04nM 的 EC_{50} 促进 ADCC (直至 80% 的靶细胞裂解)。这些数据表明与野生型 IgG1 相比较,DLE 突变增强 ADCC 活性。在 4 小时的测定中对于 22B5 IgG2 或 22B5 IgG4 未观察到 ADCC。KLH IgG1 用作阴性对照 mAb。HUVEC 和代表性肿瘤细胞系 (U87MG) 中的 ADCC 的实例示于图 8 中 (两种检测方法的代表)。

[0357] 由 22B5/DLE 和 wt 22B5 IgG1 诱导的细胞的细胞毒性与细胞系表达的 $\alpha 5 \beta 1$ 的水平相关,如图 9 中提供的数据所显示的。具有最高的 $\alpha 5 \beta 1$ 表达的细胞 (图框 A, U87MG) 显示最高水平的细胞毒性,而具有中等表达的细胞系 (图 9, Hs578T 和 3T3, a5) 显示中等细胞毒性。值得注意地,22B5/DLE 增强表达低水平 $\alpha 5 \beta 1$ 的 M24met 细胞中的 ADCC 效应 (图 9 的下图框中的实例)。这些数据表明,ADCC 至少部分由与细胞表达的 $\alpha 5 \beta 1$ 结合的抗体介导。

[0358] 实施例 7:体内抗转移功效

[0359] 除了其在内皮和肿瘤细胞中的促增殖、促迁移和促存活活性外,整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 还通过促进肿瘤细胞外渗和迁移至远端器官牵涉肿瘤转移。下列研究意在证明 22B5/DLE 在临床前模型中的抗转移功效。

[0360] A549-Luc 至肺的实验性转移的抑制

[0361] A549-Luc 是用萤光素酶基因转染的人非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞系。当静脉内植入时,其优选定位在肺中,这可通过生物发光成像 (BLI) 来测量。在该研究中,通过尾静脉将 A549-Luc 细胞注射 (3×10^6 个 / 动物) 入 SCID BALB/c 小鼠,所述小鼠在注射前 2 天已接受前剂量 (pre-dose) 的相关抗体。在植入后,每周 1 次给动物给药直至第 8 周。每周 1 次测量个体动物的生物发光直至第 20 周。

[0362] 22B5/DLE 展示优良的抗肿瘤转移功效,在第 8 周 (给药的最后一周) 具有 97% 的 TGI (肿瘤生长抑制),与对照组相比较,其在统计学上是显著的 ($p < 0.01$)。使用预期不在该模型中介导 ADCC 的 22B5 IgG2 的给药,也在第 8 周获得了 89% 的显著的 TGI (图 10A)。

在第 5、6、7 和 8 周,22B5/DLE 与 22B5 IgG2 之间的比较的 p 值分别为 0.07、0.03、0.08 和 0.17。在第 8 周后停止所有处理,然而继续每天监控不利的生理学体征并且每周通过 BLI 测量动物。

[0363] 22B5/DLE 处理组中的肿瘤在第 13 周的过程中被持续抑制,然而 22B5 IgG2 处理组中的肿瘤在给药停止后大约 2 周开始迅速生长(图 10B)。当肿瘤 BLI 达到 1×10^8 个光子/秒时,认为达到研究终点,在该时间点杀死小鼠。Kaplan-Meier 曲线(图 10C)显示,22B5/DLE 将动物的中值存活时间显著延长至 20 周,相比之下 22B5 IgG2 处理的动物为 14 周,对照组为 10 周。

[0364] 这些数据证明在该模型中,22B5 的抗肿瘤效应不完全由 ADCC 介导。即,22B5-IgG2 抑制肿瘤生长/侵袭,即使已知 IgG2 不介导效应子功能,包括细胞的细胞毒性,但抗体仍然介导抗肿瘤效应。此外,数据显示,在停止 22B5-IgG1-DLE 的施用后肿瘤生长仍然受到抑制。这些数据显示, $\alpha 5 \beta 1$ 与 FN 的结合的阻断介导了抗肿瘤效应(22B5-IgG2),所述效应进一步被 ADCC(22B5-IgG1/DLE)增强。

[0365] **实施例 8:人单克隆抗体 24C7、1D9 和 2D2 的结构特征**

[0366] 使用标准 PCR 技术从 24C7、1D9 和 2D2(分别地)杂交瘤获得编码 24C7、1D9 和 2D2 单克隆抗体的重链和轻链可变区的 cDNA 序列,然后使用标准 DNA 测序技术进行测序。

[0367] 24C7 的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别示于图 1E 和 1F 中以及 SEQ ID NO:21 和 19 中。24C7 的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别示于图 1G 和 1H 中以及 SEQ ID NO:22 和 20 中。

[0368] 1D9 的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别示于图 1I 和 1J 中以及 SEQ ID NO:31 和 29 中。1D9 的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别示于图 1K 和 1L 中以及 SEQ ID NO:32 和 30 中。

[0369] 2D2 的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别示于图 1M 和 1N 中以及 SEQ ID NO:41 和 39 中。1D9 的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别示于图 1O 和 1P 中以及 SEQ ID NO:42 和 40 中。

[0370] 原始 24C7、1D9 和 2D2 分子的亚类为 IgG1。对于 IgG1 亚类,通过定点诱变将 3 个突变导入 IgG1 恒定区(S247D、A338L 和 I340E)以进一步增加对 Fc γ R 的结合和效应子功能活性。因此,具有 IgG1 亚类且包含这 3 个突变的 24C7 称为“24C7/DLE”或“24C7 IgG1 DLE”。类似地,具有这 3 个突变的类似的抗体在本文中称为“1D9/DLE”或“1D9IgG1 DLE”以及“2D2/DLE”或“2D2 IgG1 DLE”。类似地,具有 2 个突变 S247D 和 I340E 的抗体在本文中称为“DE”突变体,例如“24C7/DE”或“24C7 IgG1 DE”。本文中描述的和具有上述突变中的任何 1、2 或 3 个的任何抗体的相似名称以相似的方式提及。例如,“1D9/DE”是指本文中描述的 1D9 抗体,其具有 IgG1 亚类并且在 Fc 区域中具有下列突变 -S247D 和 I340E。类似地,“2D2/L”是指本文中描述的 2D2 抗体,其具有 IgG1 同种型并且包含 A338L 突变,等。

[0371] 24C7 重链免疫球蛋白序列与已知的人种系免疫球蛋白重链序列的比较显示,24C7 重链利用来自人种系 V_H 3-30.3 的 V_H 区段、来自人种系 7-27 的 D 区段和来自人种系 JH 6b 的 JH 区段。使用确定 CDR 区的 Kabat 系统对 24C7 V_H 序列的分析导致重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区(如图 1F 中所示和分别示于 SEQ ID NO:13、14 和 15 中)的划定。

[0372] 24C7 轻链免疫球蛋白序列与已知的人种系免疫球蛋白轻链序列的比较显示,24C7

轻链利用来自人种系 VK L6 的 V_L 区段和来自人种系 JK2 的 JK 区段。使用确定 CDR 区的 Kabat 系统对 24C7 V_L 序列的分析导致轻链 CDR1、CDR2 和 CD3 区（如图 1H 中所示和分别示于 SEQ ID NO:16、17 和 18 中）的划定。

[0373] 1D9 重链免疫球蛋白序列与已知的人种系免疫球蛋白重链序列的比较显示,1D9 重链利用来自人种系 V_H 3-30.3 的 V_H 区段,和来自人种系 JH 6b 的 JH 区段。由于存在大量的突变,D 区段不能被赋予种系基因。使用确定 CDR 区的 Kabat 系统对 1D9 V_H 序列的分析导致如图 1J 中所示和分别示于 SEQ ID NO:23、24 和 25 中的重链 CDR1、CDR2 和 CD3 区的划定。

[0374] 1D9 轻链免疫球蛋白序列与已知的人种系免疫球蛋白轻链序列的比较显示,1D9 轻链利用来自人种系 VK L6 的 V_L 区段和来自人种系 JK1 的 JK 区段。使用确定 CDR 区的 Kabat 系统对 1D9 V_L 序列的分析导致如图 1L 中所示的和分别示于 SEQ ID NO:26、27 和 28 中的轻链 CDR1、CDR2 和 CD3 区的划定。

[0375] 2D2 重链免疫球蛋白序列与已知的人种系免疫球蛋白重链序列的比较显示,2D2 重链利用来自人种系 V_H 3-30.3 的 V_H 区段、来自人种系 7-27 的 D 区段和来自人种系 JH 6b 的 JH 区段。使用确定 CDR 区的 Kabat 系统对 2D2 V_H 序列的分析导致如图 1N 中所示和分别示于 SEQ ID NO:33、34 和 35 中的重链 CDR1、CDR2 和 CD3 区的划定。

[0376] 2D2 轻链免疫球蛋白序列与已知的人种系免疫球蛋白轻链序列的比较显示,2D2 轻链利用来自人种系 VK L6 的 V_L 区段和来自人种系 JK3 的 JK 区段。使用确定 CDR 区的 Kabat 系统对 2D2 V_L 序列的分析导致如图 1P 中所示的和分别示于 SEQ ID NO:36、37 和 38 中的轻链 CDR1、CDR2 和 CD3 区的划定。显示抗体 22B5、2D2、24C7 和 1D9 单克隆抗体的基因利用的表在下文显示为表 3。

[0377] 表 3:基因利用

[0378]

	重链			轻链	
抗体	<u>VH</u>	<u>D</u>	<u>JH</u>	<u>VK</u>	<u>JK</u>
22B5	4-39	3-10	JH 6b	Vk L6	JK 4
2D2	3-30.3	7-27	JH 6b	Vk L6	JK 3
24C7	3-30.3	7-27	JH 6b	Vk L6	JK 2
1D9	3-30.3	未确定的	JH 6b	Vk L6	JK 1

[0379] 实施例 9:人单克隆抗体 22B5、24C7、1D9 和 2D2 的结合特异性和结合动力学的表征

[0380] 在本实施例中,使用荧光活化细胞分选系统 (fluorescence activated cell sorting, FACS) 通过流式细胞术检查具有和不具有 IgG1 DLE 突变的 IgG1 亚类的 22B5、24C7、1D9 和 2D2 人抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体 (即“22B5 G1 DLE”、“22B5 G1”、“1D9 G1 DLE”、“1D9 G1”等) 的结合特异性。

[0381] 通过 FACS 测定的对 $\alpha 5 \beta 1$ 的细胞亲和力

[0382] 使用 FACS 测定,利用表达内源人整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 的细胞 (HUVEC),就它们对细胞

表面整联蛋白 $\alpha 5$ 的结合亲和力测试 22B5/DLE、24C7/DLE、1D9/DLE 和 2D2/DLE 抗体。简而言之,使用胰蛋白酶-EDTA 分离细胞,并且用冷 PBS 清洗细胞。在等分入 96 孔板后,用血清封闭细胞,然后将其与不同浓度的特异性 mAb 在 4°C 下温育 1 小时。随后,清洗细胞,将其与缀合有 R-PE 荧光团的抗人 κ 二抗一起温育,然后使用 FACSCalibur 流式细胞仪进行分析。对于每一个样品收集 10,000 个事件而不使用任何门控。为了测定 K_D ,计算各样品直方图的几何平均值,将其作为 mAb 浓度的函数进行作图。在拟合至两态平衡模型后计算 K_D 。结果示于图 11A 和 11B 中。

[0383] 实施例 10:人单克隆抗体 22B5、24C7、1D9 和 2D2 的体外 ADCC 效应子功能

[0384] 如之前实施例 6 中所述,通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 测定评估效应子功能活性。抗体 1D9、1D9/DLE、2D2/DLE、22B5/DLE 和 24C7/DLE 在代表性肿瘤细胞系 (U87MG) 中促进 ADCC (直至 80% 的靶细胞裂解) 的 EC_{50} 值示于图 12 中。

[0385] 实施例 11:转移性黑素瘤的同基因模型中的体内 ADCC 依赖性抗肿瘤功效

[0386] 为了证明 ADCC 特异性应答,在具有未受损的免疫效应细胞的同基因小鼠中,在肿瘤生长抑制 (TGI) 模型中测试人单克隆抗体 1D9/DLE (其结合人和鼠 $\alpha 5 \beta 1$ 但不功能性中和 $\alpha 5 \beta 1$)。具体地,在其中鼠黑素瘤 B16F10 细胞表达 $\alpha 5 \beta 1$ 的同基因小鼠模型中评估 ADCC 介导的抗肿瘤活性。表达整联蛋白 $\alpha 5$ 的小鼠黑素瘤细胞系 B16F10 是高度转移的并且在静脉内注射后主要定殖至肺。将肿瘤细胞静脉内注射入具有免疫能力的 C57BL/6 小鼠。通过尾静脉将 B16F10 细胞 (2×10^5 个/动物) 注射入同基因宿主 C57BL/6 小鼠,在注射前 1 天小鼠用抗体 (10mg/kg, $n = 10$ /组) 预先给药。每周 1 次用抗体皮下给动物给药,进行总共 3 周。在第 21 天,杀死动物并且切取肺。

[0387] 如图 13 中的结果所示,1D9/DLE 抗体产生显著的体内抗肿瘤功效,这表明单独的 ADCC 应答足以产生 TGI。为了描述该模型中 ADCC 的特殊作用,用 1D9 IgG2 (已知不介导 ADCC) 和 1D9 IgG1 DLE (通过 DLE 突变而 Fc 增强的 IgG1 同种型) 处理动物。对于 1D9 IgG1 DLE,观察到比 1D9 IgG2 更大的抗肿瘤功效。因为同种型对具有相同的氨基酸序列 (在抗原结合结构域中) 和体外活性,因此数据显示,作为 DLE 突变的结果的增强的 ADCC 是产生 1D9 IgG1 DLE 的优良功效的原因。

[0388] 保藏信息

[0389] 申请人已将在本文中称为 22B5 的抗体的重链和轻链可变区保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC) Manassas, VA 20110-2209 U. S. A. 22B5 VH 区域在 2008 年 7 月 16 日保藏,并且分配以 ATCC 保藏号 PTA-9377。22B5 VL 区在 2008 年 7 月 16 日保藏,并且分配 ATCC 保藏号 PTA-9377。根据关于国际承认用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约和其下细则 (布达佩斯条约) 的条款进行这些保藏。这些保藏物将在 ATCC 保藏单位无限制地维持 30 年,或在收到最新请求后维持 5 年,或维持专利的有效期,无论哪者更长,并且如果在该时期期间保藏物变得不能存活,其将被替代。保藏材料的可获得性不被解释为在违反任何政府管理机构根据其专利法律授予的权利的情况下实施本公开内容的任何方面的许可。前述书面说明书被认为足以使本领域技术人员能够实施本公开内容的所有方面。本公开内容不限于保藏材料的范围,因为保藏的实施方式意欲作为本公开内容的某些方面的举例说明,并且功能上等价的任何构建体在本公开内容的范围内。本文中材料的保藏不构成承认,即本文中的书面描述不足以使得能够实施本公开内容的任何方面,包括其最佳模式,

也不被解释为将权利要求书的范围限定至其代表的特定举例说明。事实上,除了本文中显示和描述的那些外,根据前述说明书,本公开内容的各种修饰对于本领域技术人员来说将变得很显然,并且落在所附权利要求书的范围内。

[0390] 序列表的概述 (a. a. =氨基酸 ;n. a. =核酸)

[0391]

SEQ ID NO:	序列	SEQ ID NO:	序列
1	V _H CDR1 a.a. 22B5	23	V _H CDR1 a.a. 1D9
2	V _H CDR2 a.a. 22B5	24	V _H CDR2 a.a. 1D9
3	V _H CDR3 a.a. 22B5	25	V _H CDR3 a.a. 1D9
4	V _L CDR1 a.a. 22B5	26	V _L CDR1 a.a. 1D9
5	V _L CDR2 a.a. 22B5	27	V _L CDR2 a.a. 1D9
6	V _L CDR3 a.a. 22B5	28	V _L CDR3 a.a. 1D9
7	V _H a.a. 22B5	29	V _H a.a. 1D9
8	V _L a.a. 22B5	30	V _L a.a. 1D9
9	重链 a.a. 22B5/DLE	31	V _H n.a. 1D9
10	轻链 a.a. 22B5	32	V _L n.a. 1D9
11	V _H n.a. 22B5		
12	V _L n.a. 22B5	33	V _H CDR1 a.a. 2D2
		34	V _H CDR2 a.a. 2D2
13	V _H CDR1 a.a. 24C7	35	V _H CDR3 a.a. 2D2
14	V _H CDR2 a.a. 24C7		
15	V _H CDR3 a.a. 24C7	36	V _L CDR1 a.a. 2D2
		37	V _L CDR2 a.a. 2D2
16	V _L CDR1 a.a. 24C7	38	V _L CDR3 a.a. 2D2
17	V _L CDR2 a.a. 24C7		
18	V _L CDR3 a.a. 24C7	39	V _H a.a. 2D2
		40	V _L a.a. 2D2
19	V _H a.a. 24C7	41	V _H n.a. 2D2
20	V _L a.a. 24C7	42	V _L n.a. 2D2
21	V _H n.a. 24C7	43	具有 A247D、A338L 和 I340E 突变的 IgG1 a. a. 重链恒定区
22	V _L n.a. 24C7	44	IgG1 a. a. 轻恒定区

[0001]

序列表

<110> Pfizer Inc and Medarex, Inc.

<120> α 5- β 1抗体和它们的用途

<130> PC33646

<160> 44

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

Ser Ser Ser Tyr Trp Gly
1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Asn Tyr Asn Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

His Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Leu Asp
1 5 10 15

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

[0002]

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 6

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 7

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Ser Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Asn Tyr Asn Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Leu
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

[0003]

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 9
<211> 455
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Asn Tyr Asn Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Leu
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
130 135 140

[0004]

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[0005]

405 410 415
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

 <210> 10
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 智人

 <400> 10
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

[0006]

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 11
<211> 375
<212> DNA
<213> 智人

<400> 11
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtagtagct actggggctg gatccgccag 120
ccccaggga aggggctgga gtggattggg agtatctact atagtgggag aaactacaac 180
aaccgtccc tcaagagtcg agtcaccata tccgtagaca cgtccaagaa ccagttctcc 240
ctgaagctga gctctgtgac cgccgcagac acggctgtgt attactgtgc gagacattac 300
tatggttcgg ggagttccta ctactactac gatctggacg tctggggcca agggaccacg 360
gtcaccgtct cctca 375

<210> 12
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<400> 12
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggctctctac ttctggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

Ser Tyr Ala Met His
1 5

<210> 14

[0007]

<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15

Glu Tyr Trp Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18

Gln Gln Arg Thr Asn Trp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 19
<211> 121
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19

[0008]

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Trp Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 20

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Asn Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

[0009]

<210> 21
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 21
 cagggtgcagt tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatttg atggaagcaa taaaaactac 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctatgt attactgtgc gagagaatac 300
 tggggaaact actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 22
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 22
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc aactacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcattcaaca ggccactgg catccagcc 180
 aggttcagtgc gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtaccaact ggccgtacac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 23
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 23
 Ser Thr Tyr Ala Met His
 1 5

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 24
 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

[0010]

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

Arg Glu Ser Pro Pro Ile Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu
1 5 10

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 27

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 28

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 29
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 29

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0011]

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Pro Pro Ile Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 30

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 31
<211> 366
<212> DNA
<213> 智人

<400> 31

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt ccccttcagt acctatgeta tgcaactgggt ccgccaggt 120

[0012]

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagcaa taaatactac 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagtcc 300
cccccatct actactacta cggataggac gtctggggcc aagggaaccac ggtcaccgtc 360
tctca 366

<210> 32
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<400> 32
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 33

Ser Tyr Ala Met His
1 5

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 34

Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 35

Glu Tyr Trp Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Asp Val

[0013]

1 5 10

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 36

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 38

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 39
<211> 121
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Asp
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0014]

Ala Arg Glu Tyr Trp Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
115 120

<210> 40
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 40

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 41
<211> 363
<212> DNA
<213> 智人

<400> 41

caggtgcaac tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cacccttcagt agctatgcta tgcactgggt cgcagggt	120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatttg atggaagcac taaatactac	180
gcagactccg tgaagggccg atccaccatc tccagagaca attccaagaa cagctggat	240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctctgt attactgtgc gagagaatac	300
tggggaacct actactacgg gacggacgtc tggggccaag ggaccacggt catcgtctcc	360
tca	363

[0015]

<210> 42
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 42
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtggttac agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggctcggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 43
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 43

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

[0016]

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 44
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 44

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

[0017]

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGAC
 CCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGCT
ACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGG
AGTATCTACTATAGTGGGAGAACTACAACAACCCGTCCCTCAAGAGTCG
 AGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGA
 GCTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACATTAC
TATGGTTTCGGGGAGTTCCTACTACTACTACGATCTGGACGTCTGGGGCCA
 AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

图 1A :22B5 重链可变区的 DNA 序列 (SEQ ID NO :11)

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSG
 RNYNNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHYYGSGSSYYYY
DLDVWQGQTTVTVSS

图 1B :22B5 重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :7)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA
 AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAG
CCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGAT
GCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTC
 TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTG
 CAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCTCACTTTCGGCGGA
 GGGACCAAGGTGGAGATCAAA

图 1C :22B5 轻链可变区的 DNA 序列 (SEQ ID NO :12)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQORSNWPLTFGGGTKVEIK

图 1D :22B5 轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :8)

CAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC
 TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTTATGCTATGCAC
 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCAT
TTGATGGAAGCAATAAAAACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCAT
 CTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA
 GCTGAGGACACGGCTATGTATTACTGTGCGAGAGAATACTGGGGAACTACT
ACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

图 1E :24C7 重链可变区的 DNA 序列 (SEQ ID NO :21)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISF
DGSNKNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCAREYWGTY
YGMDVWGQGTTVTVSS

图 1F :24C7 重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :19)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAACTACTTAGCCTGG
TACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA
ACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA
CTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACT
GTCAGCAGCGTACCAACTGGCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA
GATCAAA

图 1G :24C7 轻链可变区的 DNA 序列 (SEQ ID NO :22)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASOSVSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
IGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQORTNWPYTFGQGTKLEIK

图 1H :24C7 轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :20)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTCAGTACCTATGCTATGCAC
TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCAT
ATGATGGAAGCAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCAT
CTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA
GCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGTCCCCCCCCATCTACT
ACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGACCACGGTCACCGTCTCCTC
A

图 1I :1D9 重链可变区的 DNA 序列 (SEQ ID NO :31)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFSTYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISY
DGSNKYYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARESPPIYYYY
GMDVWGQGTTVTVSS

图 1J :1D9 重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :29)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
 AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGG
 TACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA
ACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA
 CTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACT
GTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGG
 AAATCAAA

图 1K :1D9 轻链可变区的 DNA 序列 (SEQ ID NO :32)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQORSNWPRTFGQGTKVEIK

图 1L :1D9 轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :30)

CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC
 TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCAC
 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCAT
TTGATGGAAGCACTAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCAT
 CTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGGATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA
 GCTGAGGACACGGCTCTGTATTACTGTGCGAGAGAATACTGGGGAACCTACT
ACTACGGGACGGACGTCCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCATCGTCTCCTCA

图 1M :2D2 重链可变区的 DNA 序列 (SEQ ID NO :41)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISF
DGSTKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLDLQMNSLRAEDTALYYCAREYWGTYYY
GTIDVWGQGTTIVVSS

图 1N :2D2 重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :39)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
 AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAACAGCTACTTAGCCTGG
 TACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA
ACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA
 CTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACT
GTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGG
 AAATCAAA

图 1O :2D2 轻链可变区的 DNA 序列 (SEQ ID NO :42)

**EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVNSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
IGIPARFSGSGSGTDFTLTISILEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK**

图 1P :2D2 轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ IDNO :40)

**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK**

图 1Q :IgG1 重链恒定区的氨基酸序列, S247D、A338L 和 I340E 突变以粗体和下划线标示 (SEQ ID NO :43)

**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**

图 1R :IgG1 轻链恒定区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :44)

V_H

种系	QLQLQESGP GLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWG WIRQPPGKGLEWI
22b5 I30S N33S	-----
种系	GSIIYSG STYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
22b5 I30S N33S	-----RN -N-----
种系	QYYYGSG SYNNYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
22b5 I30S N33S	H.-----...S-----DL-----

 V_K

种系	EIVLTQSPA TSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD
22b5 I30S N33S	-----
种系	ASNRATGIP ARFSGSGSGTDFLTISILEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGG
22b5 I30S N33S	-----
种系	GTKVEIK
22b5 I30S N33S	-----

图 2

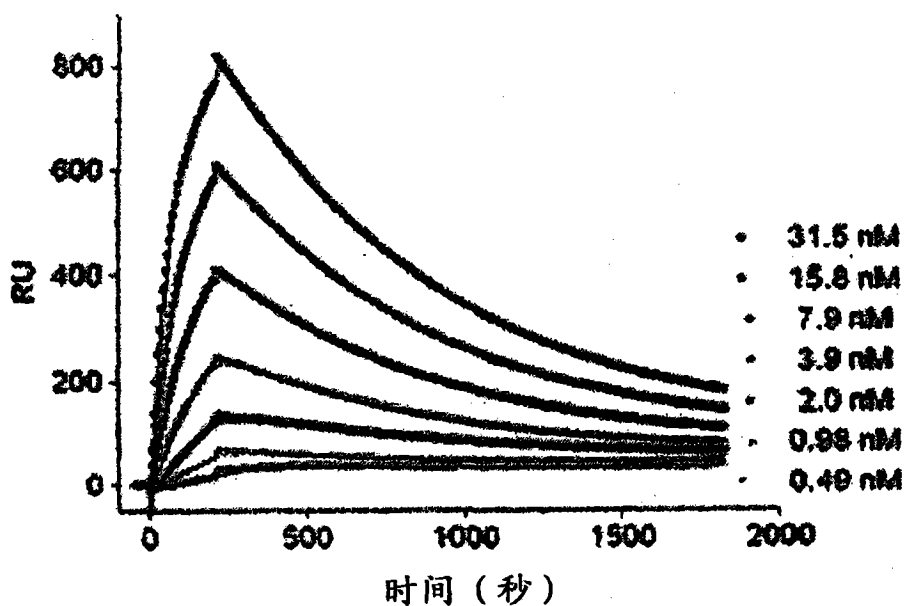


图 3

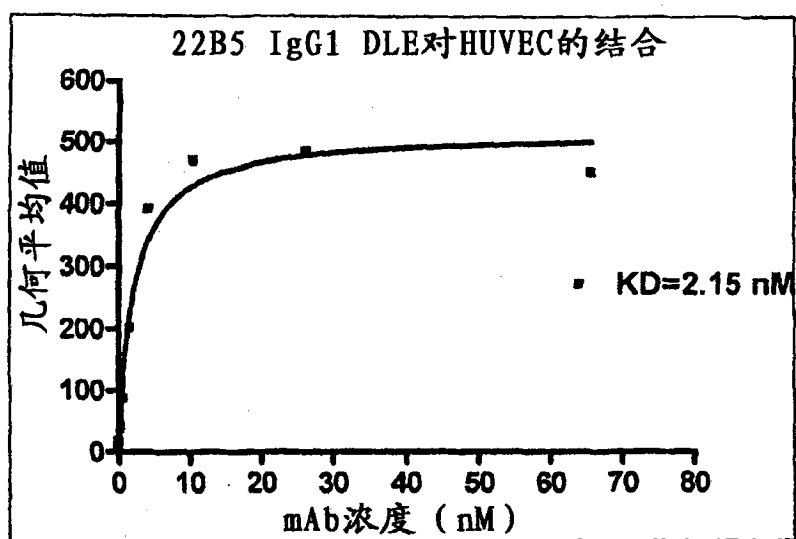


图 4

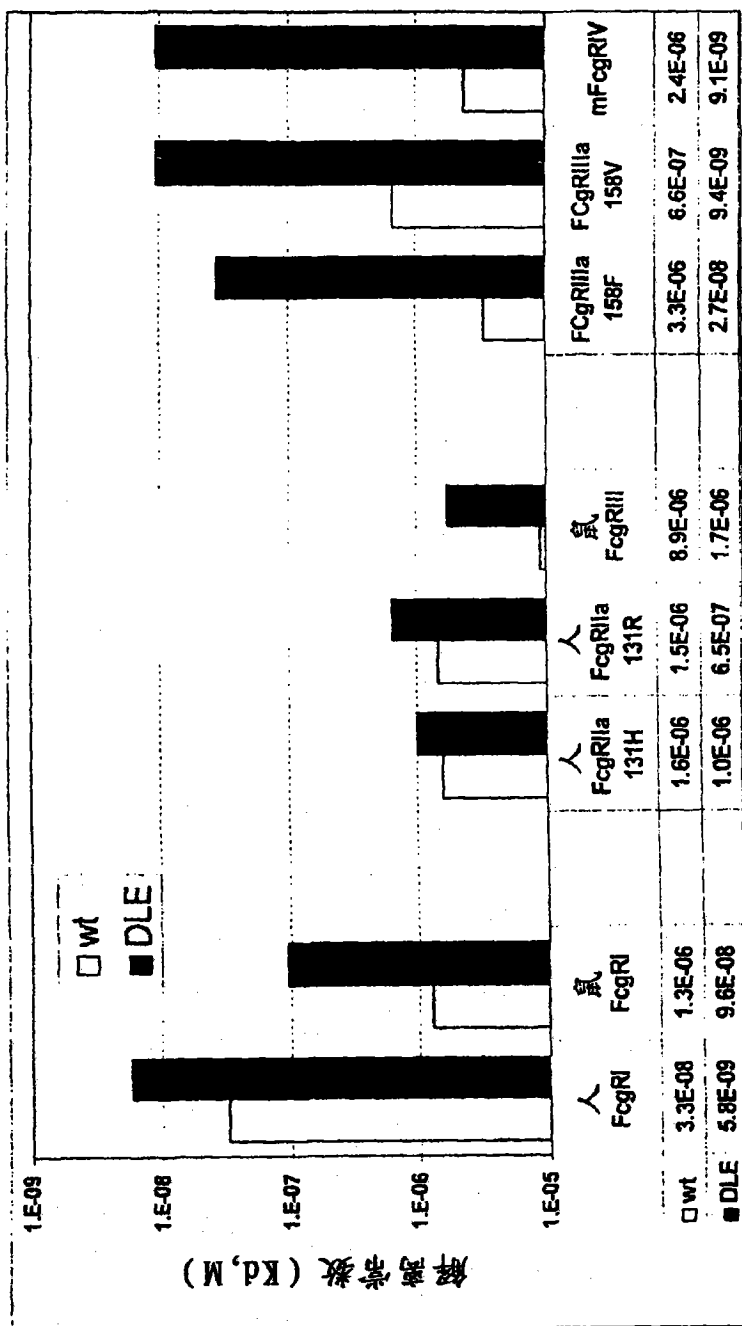


图 5

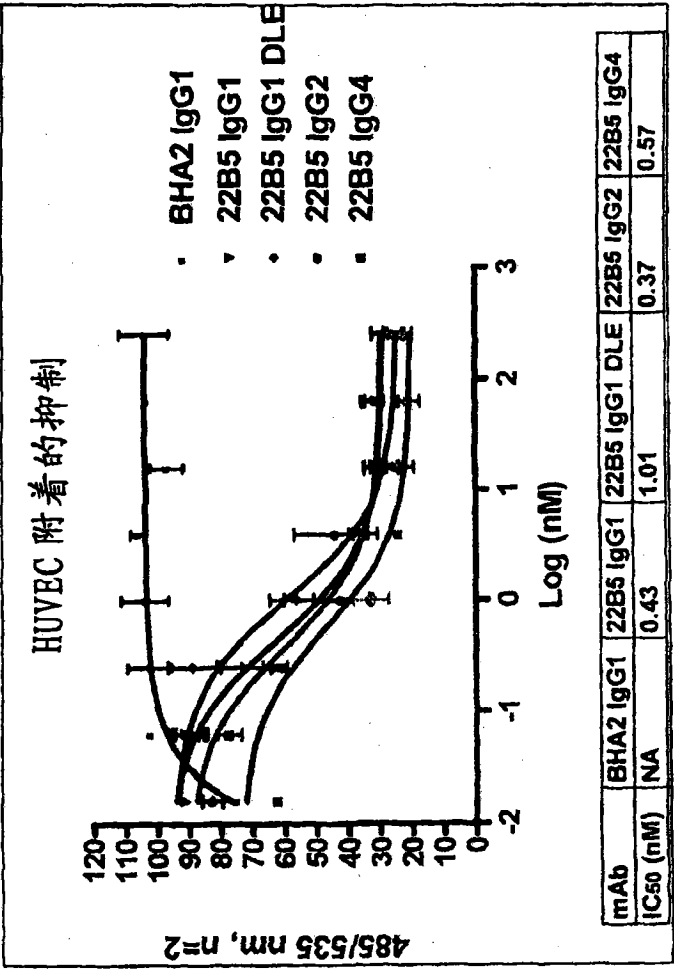


图 6

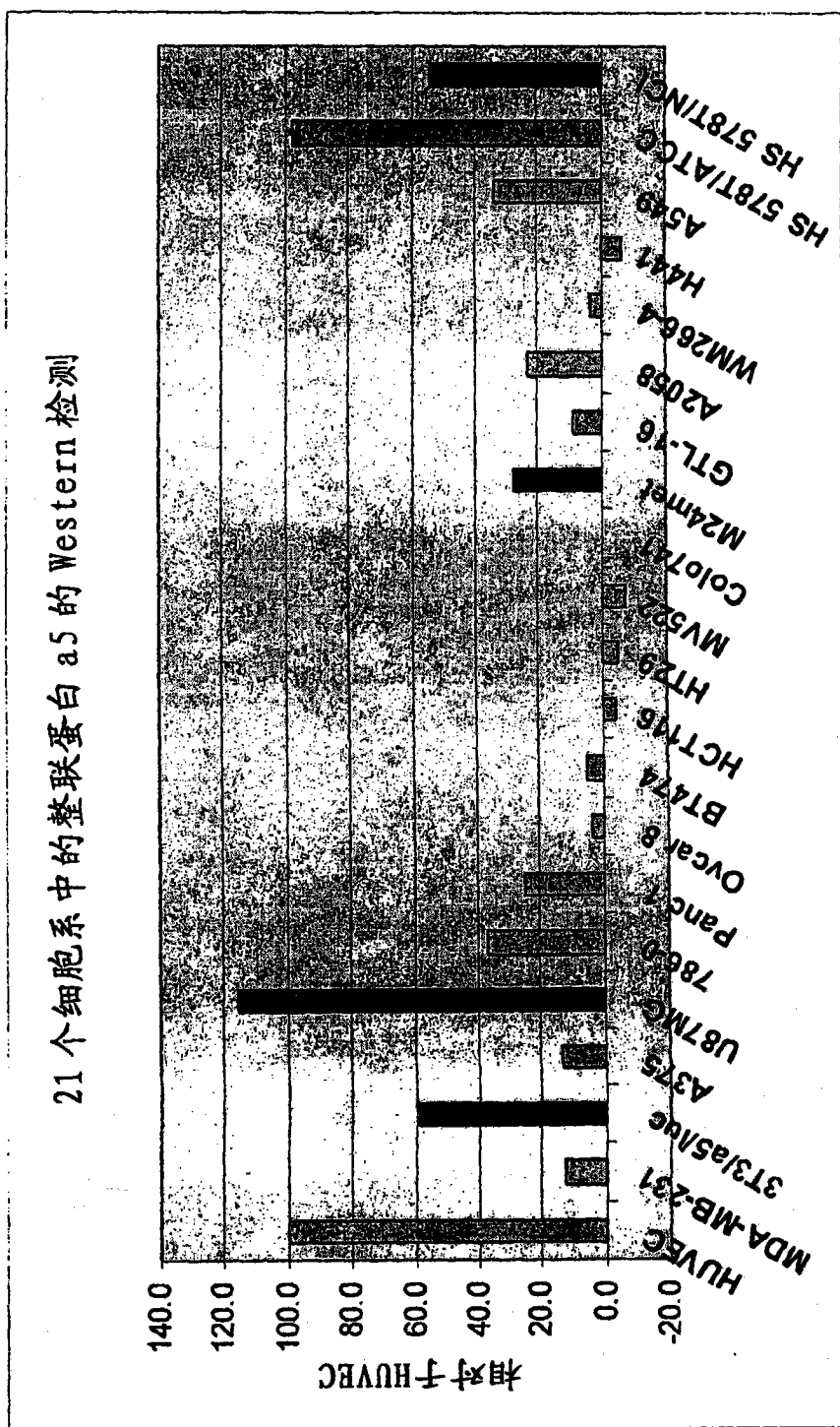


图 7

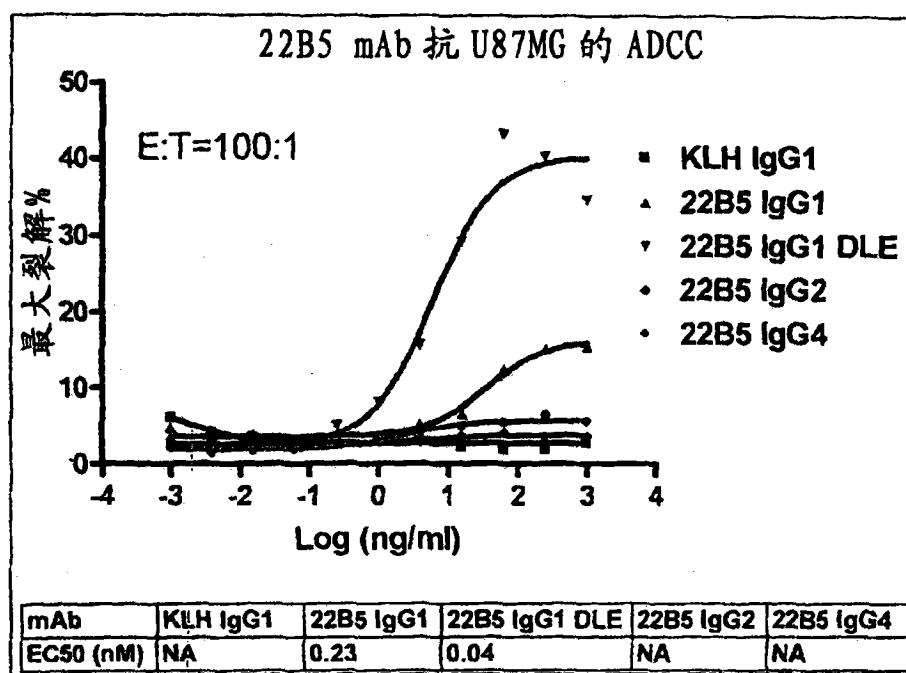


图 8A

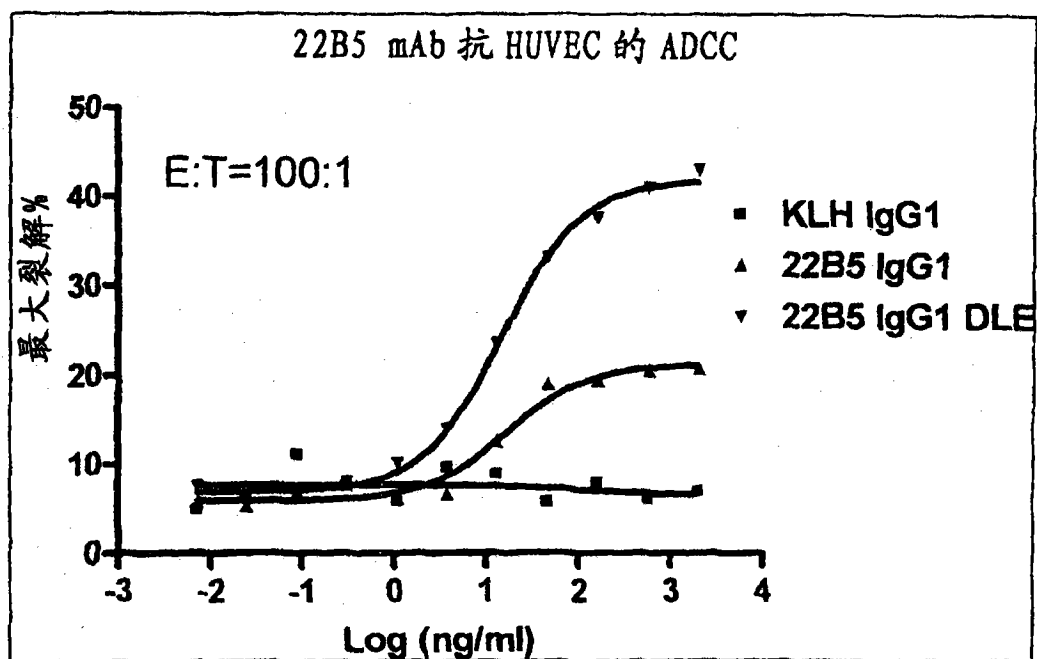


图 8B

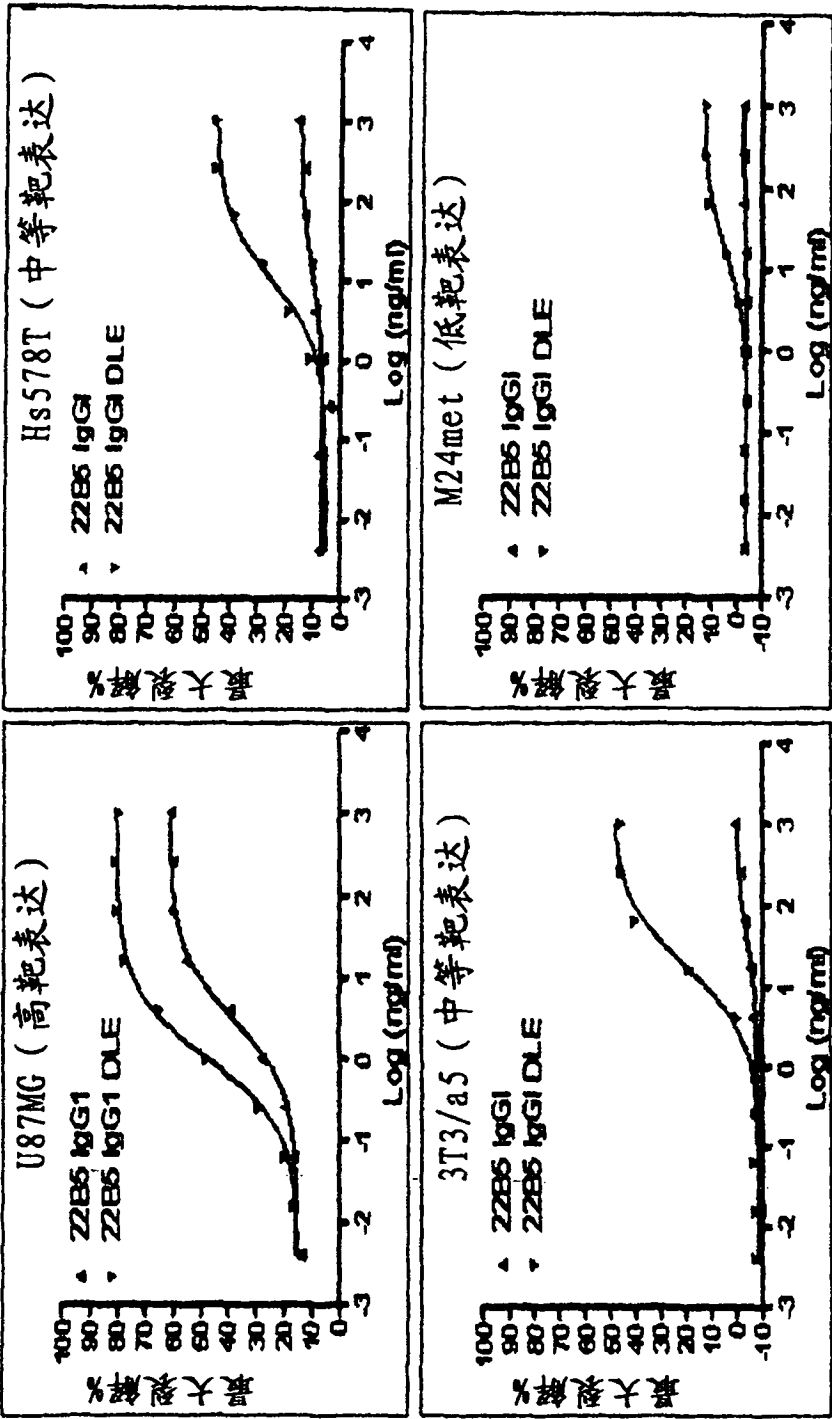


图 9

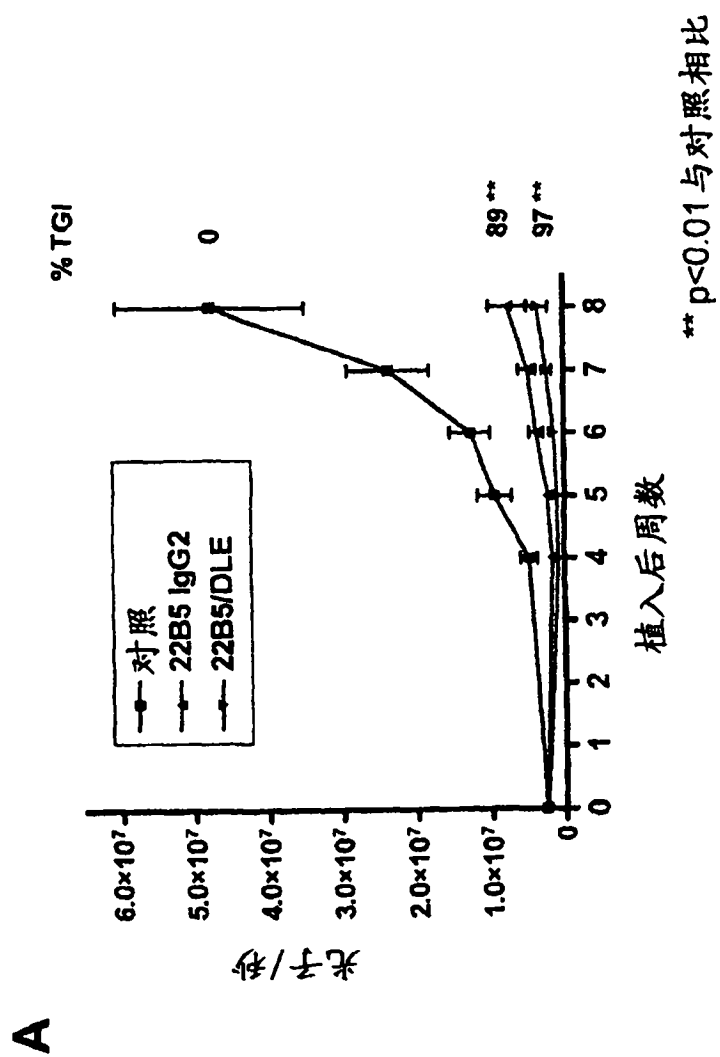


图 10A

B

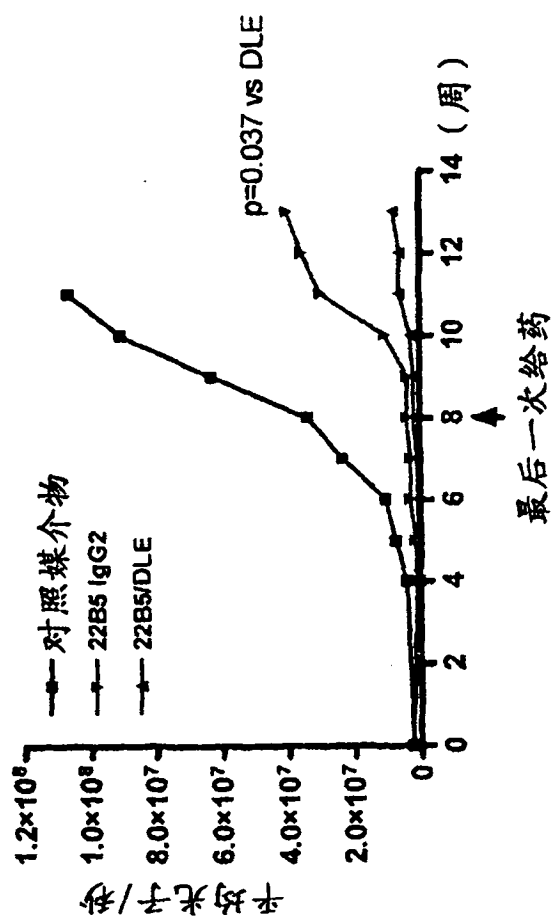


图 10B

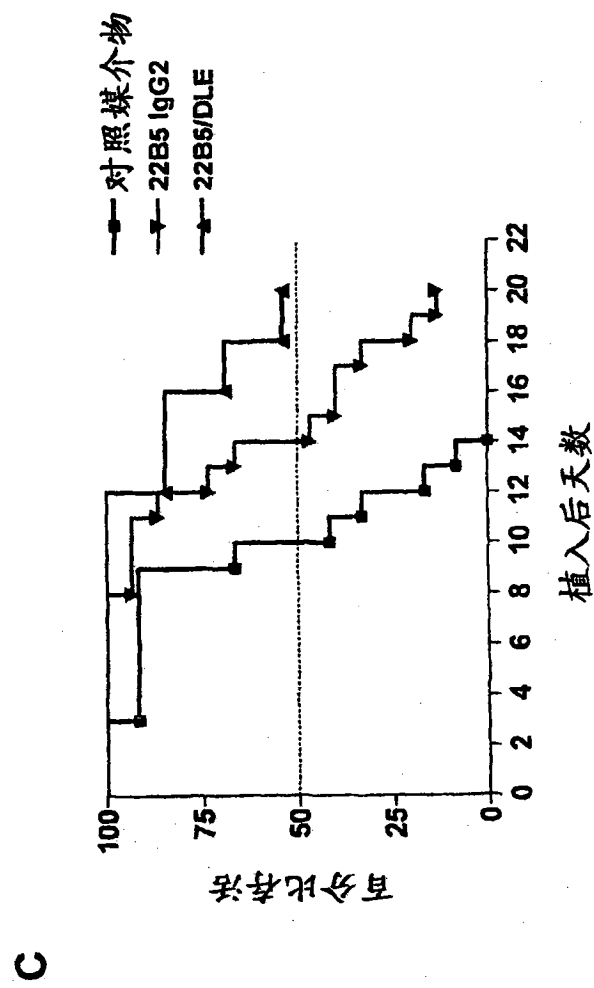


图 10C

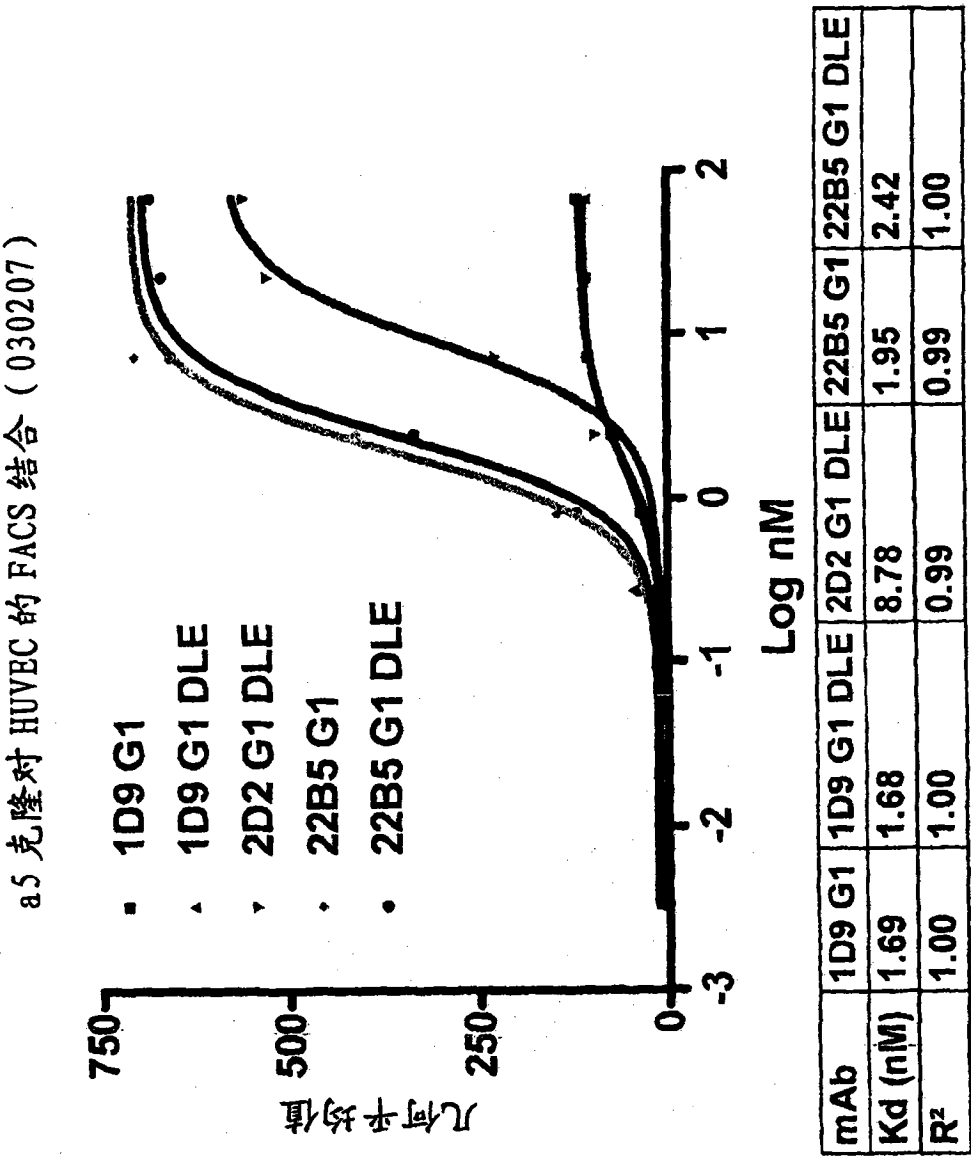
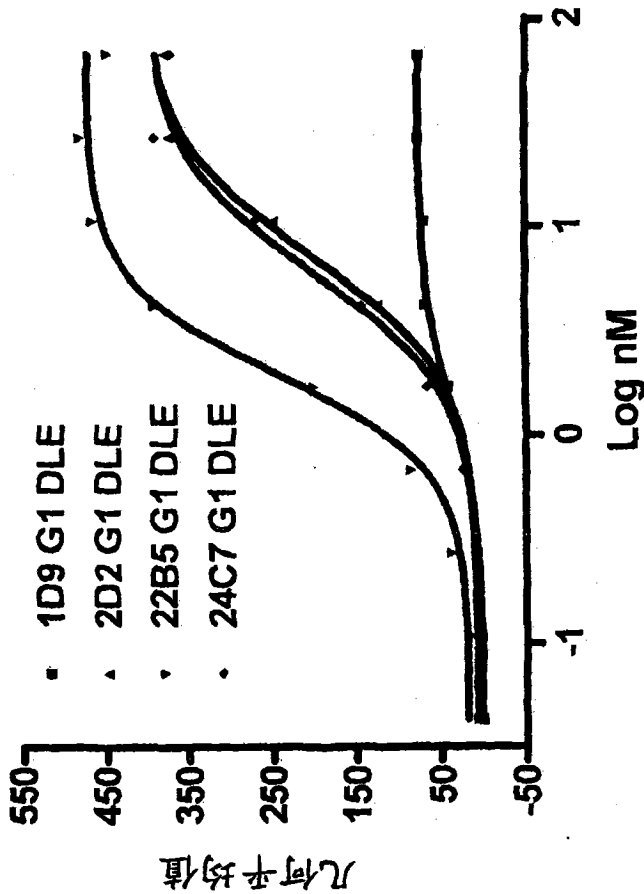


图 11A

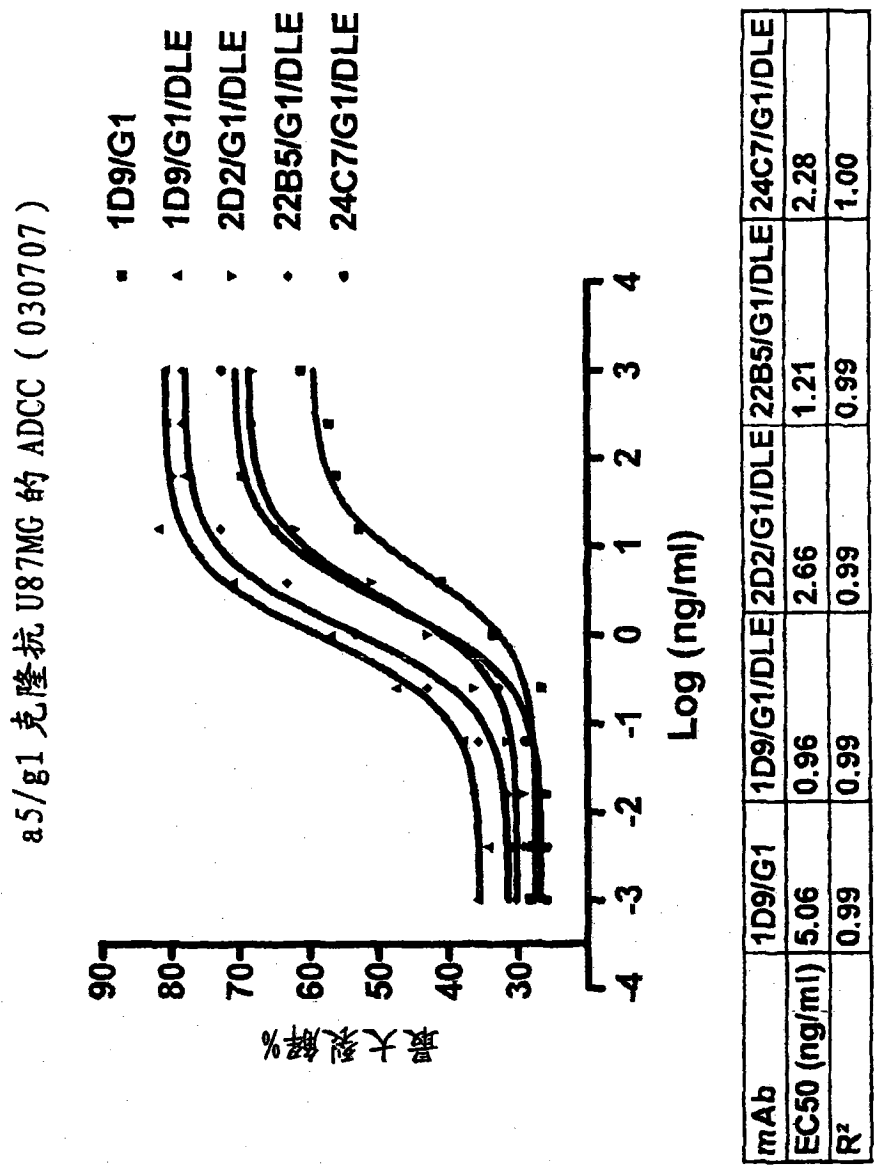
a5 g1 克隆对 HUVEC 的 FACS 结合 (031307)



mAb	1D9 G1 DLE	2D2 G1 DLE	22B5 G1 DLE	24C7 G1 DLE
Kd (nM)	1.49	7.32	1.99	6.08
R ²	1.00	1.00	1.00	0.99

注意: 24C7 未纯化

图 11B



注意: 24C7 未纯化

图 12

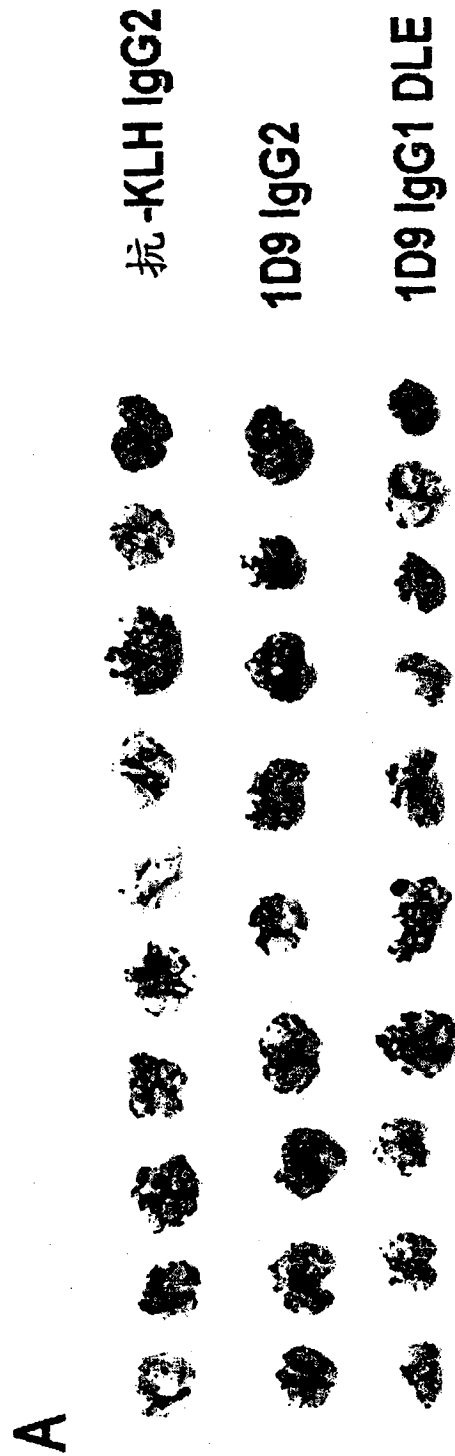


图 13A

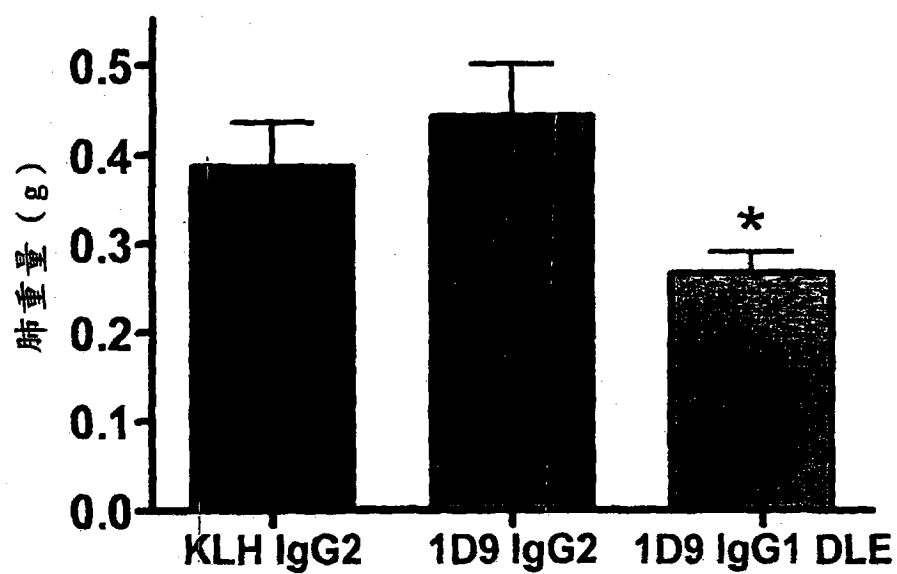
B

图 13B

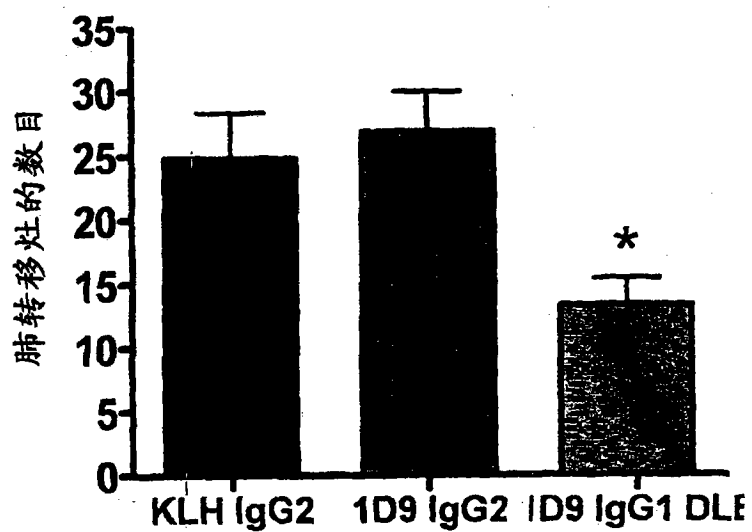
C

图 13C