(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119161478 A
(43)申请公布日 2024.12.20

(21)申请号 202411049329.7

(22)申请日 2022.05.10

(30)优先权数据
63/187,371 2021.05.11 US

(62)分案原申请数据
202280049271.9 2022.05.10

(71)申请人 帕西西娅治疗公司
地址 美国佛罗里达州

(72)发明人 利萨·赖纳

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 王玉桂 张奎燕

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61K 47/68(2017.01)

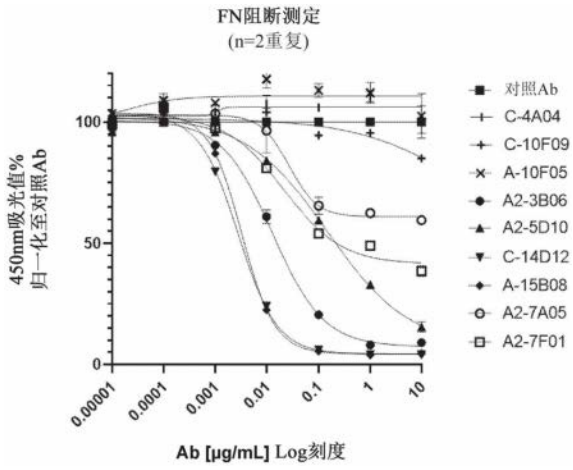
权利要求书14页 说明书105页
序列表（电子公布） 附图21页

(54)发明名称

α5β1整合素结合剂及其用途

(57)摘要

本发明公开提供了α5β1整合素结合剂(例如,抗体,包括多重特异性抗体,如双重特异性抗体)及其用途。



CN 119161478 A

1.结合至整合素α5的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

a)重链可变区(VH),其含有如包含SEQ ID NO:136所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3和/或轻链可变区(VL),其含有如包含SEQ ID NO:139所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;

b)重链可变区(VH),其含有如包含SEQ ID NO:136所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3和/或轻链可变区(VL),其含有如包含SEQ ID NO:137所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;

c)重链可变区(VH),其含有如包含SEQ ID NO:138所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3和/或轻链可变区(VL),其含有如包含SEQ ID NO:139所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;

d)重链可变区(VH),其含有如包含SEQ ID NO:138所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3和/或轻链可变区(VL),其含有如包含SEQ ID NO:137所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;

e)重链可变区(VH),其含有如包含SEQ ID NO:135所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3和/或轻链可变区(VL),其含有如包含SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;

f)重链可变区(VH),其含有如包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3和/或轻链可变区(VL),其含有如包含SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;

g)重链可变区(VH),其含有如包含SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3和/或轻链可变区(VL),其含有如包含SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;

h)重链可变区(VH),其含有如包含SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3和/或轻链可变区(VL),其含有如包含SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;

i)重链可变区(VH),其含有如包含SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3和/或轻链可变区(VL),其含有如包含SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;

j)重链可变区(VH),其含有如包含SEQ ID NO:91所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3和/或轻链可变区(VL),其含有如包含SEQ ID NO:92所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;

k)重链可变区(VH),其含有如包含SEQ ID NO:109所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3和/或轻链可变区(VL),其含有如包含SEQ ID NO:110所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;

l)重链可变区(VH),其含有如包含SEQ ID NO:140所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3和/或轻链可变区(VL),其含有如包含SEQ ID NO:141所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;

m)重链可变区(VH),其含有如包含SEQ ID NO:142所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3和/或轻链可变区(VL),其含有如包含SEQ ID NO:143所示的氨基

酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;

n)重链可变区(VH),其含有如包含SEQ ID NO:144所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3和/或轻链可变区(VL),其含有如包含SEQ ID NO:145所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;或

o)重链可变区(VH),其含有如包含SEQ ID NO:146所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3和/或轻链可变区(VL),其含有如包含SEQ ID NO:147所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

2.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中

a)所述VH,其包含

i)(1)VH CDR1,其具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列;

(2)VH CDR2,其具有SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列;和

(3)VH CDR3,其具有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列;或

ii)(1)VH CDR1,其具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列;(2)VH CDR2,其具有SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:24或VIWSDGSTTYNSSLKS所示的氨基酸序列;和

(3)VH CDR3,其具有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列;

和

b)所述VL,其包含

(i)(1)VL CDR1,其具有SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:21或RASSRVSSNSLH所示的氨基酸序列;

(2)VL CDR2,其具有SEQ ID NO:11、STSNRAT或LWIYSTSNRA所示的氨基酸序列;和

(3)VL CDR3,其具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列;或

(ii)(1)VL CDR1,其具有SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:21或RASSRVSSNSLH所示的氨基酸序列;

(2)VL CDR2,其具有SEQ ID NO:10、STSNRAS或LWIYSTSNRA所示的氨基酸序列;和

(3)VL CDR3,其具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列。

3.根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其中

a)所述VH,其包含(i)VH CDR1,其具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,(ii)VH CDR2,其具有SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列和(iii)VH CDR3,其具有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列;和

b)所述VL,其包含(i)VL CDR1,其具有SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:21或RASSRVSSNSLH所示的氨基酸序列,(ii)VL CDR2,其具有SEQ ID NO:11、STSNRAT或LWIYSTSNRA所示的氨基酸序列和(iii)VL CDR3,其具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:17或SEQ

ID NO:23所示的氨基酸序列;任选地,其中

i)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和具有RASSRVSSNSLH所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有STSNRAT所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

ii)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和具有RASSRVSSNSLH所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有STSNRAT所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

iii)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列的VH CDR3;和具有SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列的VL CDR3;

iv)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的VHCDR1、具有SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列的VH CDR3;和具有SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有LWIYSTSNRA所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的VL CDR3;或

v)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的VH CDR3;和具有SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3。

4.根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其中

a)所述VH,其包含(i)VH CDR1,其具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,(ii)VH CDR2,其具有SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列,和(iii)VH CDR3,其具有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列;和

b)所述VL,其包含(i)VL CDR1,其具有SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:21或RASSRVSSNSLH所示的氨基酸序列,(ii)VL CDR2,其具有SEQ ID NO:11、STSNRAS或LWIYSTSNRA所示的氨基酸序列,和(iii)VL CDR3,其具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列;任选地,其中

i)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和具有RASSRVSSNSLH所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有STSNRAS所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

ii)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和具有RASSRVSSNSLH所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有STSNRAS所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

iii)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:

14所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列的VH CDR3;和具有SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列的VL CDR3;

iv)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列的VH CDR3;和具有SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有LWIYSTSNRA所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的VL CDR3;或

v)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的VH CDR3;和具有SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3。

5.根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其中

a)所述VH,其包含(i)VH CDR1,其具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,(ii)VH CDR2,其具有SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:24或VIWSDGSTTYNSSLKS所示的氨基酸序列,和(iii)VH CDR3,其具有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列;和所述VL,其包含(i)VL CDR1,其具有SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:21或RASSRVSSNSLH所示的氨基酸序列,(ii)VL CDR2,其具有SEQ ID NO:11、STSNRAT或LWIYSTSNRA所示的氨基酸序列,和(iii)VL CDR3,其具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列;或

b)所述VH,其包含(i)VH CDR1,其具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,(ii)VH CDR2,其具有SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:24或VIWSDGSTTYNSSLKS所示的氨基酸序列,和(iii)VH CDR3,其具有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列;和所述VL,其包含(i)VL CDR1,其具有SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:21或RASSRVSSNSLH所示的氨基酸序列,(ii)VL CDR2,其具有SEQ ID NO:11、STSNRAS或LWIYSTSNRA所示的氨基酸序列,和(iii)VL CDR3,其具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列;任选地,其中

i)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有VIWSDGSTTYNSSLKS所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有RASSRVSSNSLH所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有STSNRAT所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

ii)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有RASSRVSSNSLH所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有STSNRAT所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

iii)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:11所示的氨基

酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列的VL CDR3;

iv)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有LWIYSTSNRA所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的VL CDR3;

v)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

vi)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有VIWSDGSTTYNSSLKS所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有RASSRVSSNSLH所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有STSNRAS所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

vii)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有RASSRVSSNSLH所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有STSNRAS所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

viii)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列的VL CDR3;

ix)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的VHCDR1、具有SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有LWIYSTSNRA所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的VL CDR3;或

x)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3。

6.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中

(A)所述VH,其包含

(a)(i)VH CDR1,其具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列;

(ii)VH CDR2,其具有SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ IDNO:19、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列;和

(iii)VH CDR3,其具有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列;

(b)(i)VH CDR1,其具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列;(ii)VH CDR2,其具有SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:8、SEQ ID

NO:14、SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列;和

(iii)VH CDR3,其具有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列;

(c)(i)VH CDR1,其具有SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列;

(ii)VH CDR2,其具有SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ IDNO:19、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列;和

(iii)VH CDR3,其具有SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列;

(d)(i)VH CDR1,其具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列;

(ii)VH CDR2,其具有SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列;和

(iii)VH CDR3,其具有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列;

(e)(i)VH CDR1,其具有SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列;

(ii)VH CDR2,其具有SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列;和

(iii)VH CDR3,其具有SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列;

(f)(i)VH CDR1,其具有SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列;

(ii)VH CDR2,其具有SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:87或SEQ ID NO:90所示的氨基酸序列;和

(iii)VH CDR3,其具有SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:88所示的氨基酸序列;或

(g)(i)VH CDR1,其具有SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:101或SEQ ID NO:105所示的氨基酸序列;

(ii)VH CDR2,其具有SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列;和

(iii)VH CDR3,其具有SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:102或SEQ ID NO:106所示的氨基酸序列;

和

(B)所述VL,其包含

(a)(i)VL CDR1,其具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列;

(ii)VL CDR2,其具有SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;和

(iii)VL CDR3,其具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列;

(b)(i)VL CDR1,其具有SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37或SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列;

(ii)VL CDR2,其具有SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列;和

(iii)VL CDR3,其具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列;

(c)(i)VL CDR1,其具有SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列;

(ii)VL CDR2,其具有SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;和

(iii)VL CDR3,其具有SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列;

(d)(i)VL CDR1,其具有SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:68或SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列;

(ii)VL CDR2,其具有SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:63或SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列;和

(iii)VL CDR3,其具有SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:69或SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列;

(e)(i)VL CDR1,其具有SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:68或SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列;

(ii)VL CDR2,其具有SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:63或SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列;和

(iii)VL CDR3,其具有SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:86或SEQ ID NO:89所示的氨基酸序列;

(f)(i)VL CDR1,其具有SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:103或SEQ ID NO:107所示的氨基酸序列;

(ii)VL CDR2,其具有SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列;和

(iii)VL CDR3,其具有SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:104或SEQ ID NO:108所示的氨基酸序列;任选地,其中

(1)所述VH,其包含(i)VH CDR1,其具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,(ii)VH CDR2,其具有SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列,和(iii)VH CDR3,其具有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列;和所述VL,其包含(i)VL CDR1,其具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,(ii)VL CDR2,其具有SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列,和(iii)VL CDR3,其具有SEQID NO:6、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:23所示

的氨基酸序列;

(2)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(3)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(4)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(5)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(6)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列的VLCDR1、具有SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(7)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(8)所述VH,其包含(i)VH CDR1,其具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,(ii)VH CDR2,其具有SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,和(iii)VH CDR3,其具有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列;和所述VL,其包含(i)VL CDR1,其具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,(ii)VL CDR2,其具有SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列,和(iii)VL CDR3,其具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列;

(9)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(10)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,

其包含具有SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(11)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(12)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(13)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(14)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(15)所述VH,其包含(i)VH CDR1,其具有SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列,(ii)VH CDR2,其具有SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列,和(iii)VH CDR3,其具有SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列;和所述VL,其包含(i)VLCDR1,其具有SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37或SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列,(ii)VL CDR2,其具有SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列和(iii)VL CDR3,其具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列;

(16)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(17)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(18)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(19)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:

14所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(20)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(21)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(22)所述VH,其包含(i)VH CDR1,其具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,(ii)VH CDR2,其具有SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,和(iii)VH CDR3,其具有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列;和所述VL,其包含(i)VL CDR1,其具有SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列,(ii)VL CDR2,其具有SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列,和(iii)VL CDR3,其具有SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列;

(23)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(24)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(25)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(26)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(27)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(28)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(29)所述VH,其包含(i)VH CDR1,其具有SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列,(ii)VH CDR2,其具有SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列,和(iii)VH CDR3,其具有SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列;和所述VL,其包含(i)VL CDR1,其具有SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:68或SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列,

(ii)VL CDR2,其具有SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:63或SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列,和(iii)VL CDR3,其具有SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:69或SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列;

(30)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(31)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:61所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(32)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(33)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:66所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的VHCDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:69所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(34)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(35)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(36)所述VH,其包含(i)VH CDR1,其具有SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列,(ii)VH CDR2,其具有SEQ ID NO:79、SEQ

ID NO:82、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:87或SEQ ID NO:90所示的氨基酸序列,和(iii)VH CDR3,其具有SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:85或SEQ ID NO:88所示的氨基酸序列;和所述VL,其包含(i)VL CDR1,其具有SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:68或SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列,

(ii)VL CDR2,其具有SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:63或SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列,和(iii)VL CDR3,其具有SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:86或SEQ ID NO:89所示的氨基酸序列;

(37)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:80所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:81所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(38)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:81所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(39)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:80所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:81所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(40)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:84所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(41)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:87所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:88所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:89所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(42)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:90所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:80所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:81所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(43)所述VH,其包含(i)VH CDR1,其具有SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:101或SEQ ID NO:105所示的氨基酸序列,(ii)VH CDR2,其具有SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列,和(iii)VH CDR3,其具有SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:102或SEQ ID NO:106所示的氨基酸序列;和所述VL,其包含(i)VL CDR1,其具有SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:103或SEQ ID NO:107所示的氨基酸序列,(ii)VL CDR2,其具有SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列,和(iii)VL CDR3,其具有SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:104或SEQ ID NO:108所示的氨基酸序列;

(44)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:93所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:94所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:95所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(45)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:97所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:98所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:99所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(46)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:100所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:94所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:95所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(47)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:101所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:102所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:103所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:104所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(48)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:105所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:106所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:107所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:108所示的氨基酸序列的VL CDR3;

(49)所述VH,其包含具有SEQ ID NO:93所示的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:94所示的氨基酸序列的VH CDR3;和所述VL,其包含具有SEQ ID NO:95所示的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列的VL CDR3。

7.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中

(i)所述VH具有SEQ ID NO:136所示的氨基酸序列,所述VL具有SEQ ID NO:139所示的氨基酸序列;

(ii)所述VH具有SEQ ID NO:136所示的氨基酸序列,所述VL具有SEQ ID NO:137所示的氨基酸序列;

(iii)所述VH具有SEQ ID NO:138所示的氨基酸序列,所述VL具有SEQ ID NO:139所示的氨基酸序列;

(iv)所述VH具有SEQ ID NO:138所示的氨基酸序列,所述VL具有SEQ ID NO:137所示的氨基酸序列;

(v)所述VH具有SEQ ID NO:135所示的氨基酸序列,所述VL具有SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列;

(vi)所述VH具有SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,所述VL具有SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列;

(vii)所述VH具有SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列,所述VL具有SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列;

(viii)所述VH具有SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列,所述VL具有SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列;

(ix)所述VH具有SEQ ID NO:109所示的氨基酸序列,所述VL具有SEQ ID NO:110所示的氨基酸序列;

(x)所述VH具有SEQ ID NO:144所示的氨基酸序列,所述VL具有SEQ ID NO:145所示的氨基酸序列;

(xi)所述VH具有SEQ ID NO:146所示的氨基酸序列,所述VL具有SEQ ID NO:147所示的氨基酸序列;

(xii)所述VH具有SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列,所述VL具有SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列;

(xiii)所述VH具有SEQ ID NO:91所示的氨基酸序列,所述VL具有SEQ ID NO:92所示的氨基酸序列;

(xiv)所述VH具有SEQ ID NO:140所示的氨基酸序列,所述VL具有SEQ ID NO:141所示的氨基酸序列;或

(xv)所述VH具有SEQ ID NO:142所示的氨基酸序列,所述VL具有SEQ ID NO:143所示的氨基酸序列。

8.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中

(i)所述VH区或VL区还包含(a)人框架序列;和/或(b)框架1(FR1)、框架2(FR2)、框架3(FR3)和/或框架4(FR4)序列;

(ii)所述抗体是单克隆抗体;

(iii)所述抗体是人源化抗体、人抗体或嵌合抗体;

(iv)所述抗体是单链抗体分子、双重可变区抗体、单可变区抗体、线性抗体、V区或者由抗体片段形成的多重特异性抗体;

(v)所述抗体是Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、单链可变片段scFv或(scFv)2;和/或

(vi)所述整合素α5是人整合素α5。

9.缀合物,其包含根据权利要求1-8任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段缀合或重组融合至诊断试剂、可检测试剂或治疗剂,其中所述治疗剂任选地是化疗剂、细胞毒素或药物。

10.多核苷酸,其包含根据权利要求1-8任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

α5β1整合素结合剂及其用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请为2022年5月10日提交的、发明名称为“α5β1整合素结合剂及其用途”、申请号为202280049271.9的中国发明专利申请的分案申请。

[0003] 本发明申请主张2021年5月11日提交的美国临时专利申请No.63/187,371的权益，该专利申请的公开内容以其全部作为参考并入本文。

[0004] 序列表

[0005] 本发明申请作为参考并入了作为于2022年5月8日创建并且大小为142,533字节的标题为“14700-001-228_SEQ_LISTING.txt”的文本文件与本发明申请一起提交的序列表。

技术领域

[0006] 本发明公开一般地涉及结合至α5β1(α5β1)整合素，包括人α5β1整合素的结合剂，如抗体，和它们的使用方法。

背景技术

[0007] 整合素是结合胞外基质(ECM)组分并调控细胞粘附、迁移和激活的跨膜蛋白。每个整合素由α和β跨膜整合素亚基组成。在人基因组中有18个α整合素亚基和8个β整合素亚基，并且它们组合以产生23种独特的杂二聚体整合素。这些杂二聚体通过被称为“由内到外”和“由外到内”信号转导的机制调控细胞行为。前者中，胞内蛋白结合整合素胞质结构域并稳定以高亲合力结合胞外配体的构象。然后，通过“由外到内”信号转导，配体结合的整合素刺激调控细胞行为的胞内信号转导级联。

[0008] α5β1整合素由于其对胞外基质(ECM)中FN的高亲和力而被称为纤连蛋白(FN)受体。通过α5β1头盔(headpiece)中的α和β亚基与FN的III型重复中精氨酸-甘氨酸-门冬氨酸(RGD)肽基序之间界面处配体结合位点介导这种结合。α5β1整合素结合其它含RGD的蛋白，如骨桥蛋白和肌原纤维蛋白，以及缺少RGD基序的蛋白，包括CD40L、IL-1b和TNF-α转化酶ADAM-17。与其配体的组织分布一致，通过外周组织和中枢神经系统(CNS)中多种细胞类型，包括内皮细胞、肥大细胞和巨噬细胞谱系(例如，小神经胶质细胞和血管周围巨噬细胞)表达α5β1。

[0009] 在α5β1整合素与肿瘤血管生成之间建立了良好的联系。另外，已证实α5β1存在在肿瘤细胞上。已表明结合α5β1的抗体不仅抑制血管生成，而且还有助于杀伤α5β1表达肿瘤细胞。还已证实了α5β1整合素与神经炎性疾病，包括多发性硬化(MS)和肌萎缩性侧索硬化(ALS)之间的联系。已表明结合至α5β1的抗体改善MS的实验性自身免疫性脑炎(EAE)模型和ALS的$SOD1^{G93A}$转基因模型中的症状。尽管α5β1的表达似乎将使其具有成为抗血管生成和癌症疗法以及神经炎性疾病疗法中的靶标的潜力，但是使用靶向α5整合素的抗体的临床成功尚未实现。

[0010] 因此，本领域仍需要可以靶向α5β1整合素以治疗、预防或减轻α5-介导的疾病、病症或病况，包括涉及表达α5β1的细胞，如肿瘤细胞和巨噬细胞的那些的试剂。

发明概述

[0011] 本发明公开提供了α5β1整合素结合剂,包括人α5β1整合素结合剂。这些试剂包括结合至α5β1整合素的抗体,例如,结合至α5β1整合素的单特异性或多重特异性(例如,双重特异性)抗体。在一些实施方式中,这些抗体与具有如本文所描述的(例如,表1-6)重链可变区和轻链可变区的抗体竞争性地与人α5β1整合素结合。

[0012] 本发明公开还提供了包含α5β1整合素结合剂的组合物。在一些实施方式中,这些组合物包括结合至α5β1整合素的抗体,例如,结合至α5β1整合素的单特异性或多重特异性(例如,双重特异性)抗体。在一些实施方式中,这些组合物包括与具有本文所描述的(例如,表1-6)重链可变区和轻链可变区的抗体竞争性地与人α5β1整合素结合的抗体。

[0013] 本发明公开还提供了治疗、预防或减轻α5β1整合素-介导的疾病、病症或病况的方法,包括用α5β1整合素结合剂或者包含所述试剂,包括α5β1整合素结合剂的组合物或者包含所述试剂的组合物治疗、预防或减轻所述疾病、病症或病况的一种或多种症状的方法。这些组合物包括结合至α5β1整合素的抗体,例如,结合至α5β1整合素的单特异性或多重特异性(例如,双重特异性)抗体。

附图说明

[0014] 图1显示了实施例5中进一步描述的纤连蛋白(FN)抑制测定的示例性结果。

[0015] 图2A-2B显示了(i)A-15B08、A2-3B06、A2-5D10、C-14D12和(ii)A2-7A05、A2-7F01的重链可变区和轻链可变区,包括VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的示例性共有序列的序列比对。根据Kabat、AbM、Chothia、Contact和IMGT表示CDR的边界(还参见,例如,表1-6)。

[0016] 图2C-2D显示了A-15B08-T62A的重链可变区和轻链可变区以及示例性人工程化可变区A-15B08_Low和A-15B08_Low+Mod的序列比对。根据Kabat、AbM、Chothia、Contact和IMGT表示CDR的边界。

[0017] 图2E-2F显示了A-7A05的重链可变区和轻链可变区以及示例性人工程化可变区A-7A05_Low和A-7A05_Low+Mod的序列比对。根据Kabat、AbM、Chothia、Contact和IMGT表示CDR的边界。

[0018] 图2G-2H显示了C-14D12的重链可变区和轻链可变区以及示例性人工程化C-14D12_Low和C-14D12_Low+Mod的序列比对。根据Kabat、AbM、Chothia、Contact和IMGT表示CDR的边界。

[0019] 图3显示了示例性Fc序列,包括变体Fc序列的序列比对。

[0020] 图4A和4B显示了实施例7中进一步描述的破坏α5β1-FN整合素-配体复合物的本文所提供的抗体的示例性结果。

[0021] 图5显示了实施例8中进一步描述的α5β1整合素FN阻断测定的示例性结果。

[0022] 图6显示了实施例8中进一步描述的与杂交瘤相比,嵌合体效力的示例性结果。

[0023] 图7显示了实施例8中进一步描述的多种IgG4嵌合抗体的示例性SDS-PAGE结果。

[0024] 图8显示了实施例9中进一步描述的构象测定的示例性结果。

[0025] 图9显示了实施例10中进一步描述的细胞粘附测定的示例性结果。

发明详述

[0026] 本发明公开提供了α5β1整合素结合剂。这些试剂包括结合至α5β1整合素的抗体(例如,单特异性或多重特异性,包括双重特异性),包括结合至人α5β1整合素的抗体。这些结合剂在组合物中和在治疗、预防或减轻α5β1整合素-介导的疾病、病症或病况,包括所述疾病、病症或病况的一种或多种症状的方法中有用。α5β1整合素-介导的疾病、病症或病况包括癌症、血管生成-介导的疾病(例如,具有异常血管生成的疾病)和炎性疾病(例如,神经炎性疾病)。另外,本文所描述的α5β1整合素结合剂,如α5β1整合素结合抗体(例如,单特异性或多重特异性抗体,包括双重特异性抗体)对于(i)抑制α5β1整合素与纤连蛋白结合,(ii)抑制血管生成和/或(iii)治疗或减轻(i)癌症、(ii)血管生成-介导的疾病、病症或病况,或者(iii)炎性疾病、病症或病况的一种或多种症状有用。如本文所描述的α5β1整合素结合剂,如α5β1整合素结合抗体(例如,单特异性或多重特异性,包括双重特异性)在组合物和在α5β1-介导的疾病、病症或病况的治疗方法中有用。

[0027] 除非另外说明,否则术语"α5整合素"、"CD49e"或者"α5整合素多肽"以及类似术语是指来自任何脊椎动物来源,包括哺乳动物,如灵长类动物(例如,人、食蟹猴(cyno))、狗和啮齿类(例如,小鼠和大鼠)的多肽("多肽"和"蛋白质"在本文中是可互换使用的)或者任何天然α5整合素。α5整合素,在本领域中也被称为整合素α-5、ITGA5蛋白、CD49e抗原、糖蛋白Ic(GPIc)、VLA5A、FNRA和纤连蛋白受体亚基α,具有多个结构域,包括β-螺旋桨(例如,具有7个60个氨基酸的FG-GAP重复)、thigh、genu、calf1、calf2、跨膜和胞内结构域以及4个钙结合位点。术语α5整合素涵盖了"全长"未处理的α5整合素,以及由细胞中的加工所产生的α5整合素的任何形式或其任何片段。术语α5整合素还涵盖了α5整合素的天然存在的变体,如SNP变体、剪接变体和等位变体。作为异源二聚体与β1结合的α5整合素在本领域中已知与一些配体(例如,纤连蛋白)相互作用,并且这种相互作用导致蛋白构象变化和信号转导,从而导致细胞活动,如细胞粘附、增殖、细胞凋亡、迁移和吞噬的变化。以下提供了人α5整合素的全长氨基酸序列(示例性信号序列=斜体文本;示例性胞外结构域=加下划线的文本):

[0028] *MGSRTPESPLHAVQLRWGPRRRPPLLPLLLLLLPPPPRVGG*FNLDAEAPAVLSGPPG
SFFGFSVEFYRPGTDGVSVLVGAPKANTSQPGVLQGGAVYLCPWGASPTQCTPIEFDS
KGSRLLESSLSSSEGEEPVEYKSLQWFGATVRAHGSSILACAPLYSWRTEKEPLSDPV
GTCYLSTDNFTRILEYAPCRSDFSWAAGQGYCQGGFSAEFTKTGRVVLGGPGSYFWQ
GQILSATQEQIAESYYPEYLINLVQGQLQTRQASSIYDDSYLGYSVAVGEFSGDDTEDF
VAGVPKGNLTYGYVTILNGSDIRSLYNFSGEQMASYFGYAVAATDVNGDGLDDLLVG
APLLMDRTPDGRPQEVGRVYVYLQHPAGIEPTPTLTLTGHDEFGRFGSSLTPLGDLDQ
DGYNDVAIGAPFGGETQQGVVFVFPGGPGGLGSKPSQVLQPLWAASHTPDFFGSALR
GGRDLDGNGYPDLIVGSFGVDKAVVYRGRPIVSASASLTIFPAMFNPEERSCSLEGNP
VACINLSFCLNASGKHVADSIGFTVELQLDWQKQKGGVRRALFLASRQATLTQTLLIQ
NGAREDCREMKIYLRNESEFRDKLSPIHIALNFSLDPQAPVDSHGLRPALHYQSKSRIE
DKAQILLDCGEDNICVPDLQLEVFGEQNHVYLGDKNALNLTFHAQNVGEGGAYEAE
LRVTAPPEAEYSGLVRHPGNFSSLSCDYFAVNQSRLLVCDLGNPMKAGASLWGGLRF
TVPHLRDTKKTIQFDFQILSKNLNNSQSDVVSFRLSVEAQAQVTLNGVSKPEAVLFPV

[0029] SDWHPRDQPQKEEDLGPAVHHVYELINQGPSSISQGVLELSCPQALEGQQLLYVTRVT
GLNCTTNHPINPKGLELDPEGSLHHQQKREAPSRSSASSGPQILKCPEAECFRLRCELG
PLHQQESQSLQLHFRVWAKTFLQREHQPFSLQCEAVYKALKMPYRILPRQLPQKERQ
VATAVQWTKAEGSYGVPLWIIILAILFGLLLLGLLIYILYKLGFFKRSLPYGTAMEKAQ
LKPPATSDA (SEQ ID NO: 111)。

[0030] 以下提供了小鼠α5整合素的全长氨基酸序列(示例性信号序列=斜体文本;示例

性胞外结构域＝加下划线的文本)：

[0031] *MGSWTPRSPRSPLHAVLLRWGPRRLPPLLPLLLLLWPPPLQVGG*FNLDAEAPAVLS GPPGSLFGFSVEFYRPGRDGVSVLVGAPKANTSQPGVLQGGAVYVCPWGTSPIQCTTI QFDSKGSRILESSLYSAKGEEPVEYKSLQWFGATVRAHGSSILACAPLYSWRTEKDPQ NDPVGTCYLSTENFTRILEYAPCRSDFGSAAGQGYCQGGFSAEFTKTGRVVLGGPGS YFWQGQILSATQEQISESYYPEYLINPVQGQLQTRQASSVYDDSYLGYSVAVGEFSGD DTEDFVAGVPKGNLTYGYVTVLNGSDIHSLYNVSGEQMASYFGYAVAATDTNGDGL DDLLVGAPLLMERTADGRPQEVGRVYIYLQRPAGIDPTPTLTLTGQDEFSRFGSSLTPL GDLDQDGYNDVAIGAPFGGEAQQGVVFIFPGGPGGLSTKPSQVLQPLWAAGRTPDFF GSALRGGRDLDGNGYPDLIVGSFGVDKALVYRGRPIISASASLTIFPSMFNPEERSCSL EGNPVSCINLSFCLNASGKHVPNSIGFEVELQLDWQKQKGGVRRALFLTSKQATLTQT LLIQNGAREDCREMKIYLRNESEFRDKLSPIHIALNFSLDPKAPMDSHGLRPVLHYQS KSRIEDKAQILLDCGEDNICVPDLQLDVYGEKKHVYLGDKNALNLTFHAQNLGEGG AYEAELRVTAPLEAEYSGLVRHPGNFSSLSCDYFAVNQSRQLVCDLGNPMKAGTSLW GGLRFTVPHLQDTKKTIQFDFQILSKNLNNSQSNVVSFPLSVEAQAQVSLNGVSKPEA VIFPVSDWNPQDQPQKEEDLGPAVHHVYELINQGPSSISQGVLELSCPQALEGQQLLY VTKVTGLSNCTSNYTPNSQGLELDPETSPHHLQKREAPGRSSTASGTQVLKCPEAKCF RLRCEFGPLHRQESRSLQLHFRVWAKTFLQREYQPFSLQCEAVYEALKMPYQILPRQL PQKKLQVATAVQWTKAEGSNGVPLWIIILAILFGLLLLGLLIYVLYKLGFFKRSLPYGT AMEKAQLKPPATSDA (SEQ ID NO: 112)。

[0032] 术语α5整合素还涵盖的其它相关α5整合素多肽包括保留α5整合素活性和/或足以产生抗-α5整合素免疫应答的片段、衍生物(例如,替换、缺失、截短和插入变体)、融合多肽和种间同源物。如本领域技术人员将理解的,本文所描述的α5整合素结合剂(例如,抗体)可以结合至α5整合素多肽、α5整合素多肽片段、α5整合素抗原和/或α5整合素表位。表位可以是较大的α5整合素抗原的一部分,其可以是较大的α5整合素多肽片段的一部分,其反过来可以是较大的α5整合素多肽的一部分。α5整合素可以以天然或变性形式存在。本文所描述的α5整合素多肽可以分离自多种来源,如人组织类型或另一种来源,或者通过重组或合成方法制备。α5整合素多肽可以包含具有与天然来源的相应α5整合素多肽相同的氨基酸序列的多肽。α5整合素多肽的直系同源物在本领域中也是熟知的。

[0033] 除非另外说明,否则术语“β1整合素”、“CD29”或者“β1整合素多肽”和类似术语是指来自任何脊椎动物来源,包括哺乳动物,如灵长类动物(例如,人、食蟹猴(cyno))、狗和啮齿类(例如,小鼠和大鼠)的多肽(“多肽”和“蛋白”在本文中是可互换使用的)或者任何天然β1整合素。β1整合素,本领域中还被称为整合素β-1、ITGB1蛋白、CD29抗原、纤连蛋白受体亚基β和糖蛋白IIa,具有多个结构域,包括β1头盔、杂交体和丛蛋白-信号蛋白-整合素(plexin-semaphoring-integrin,PSI)结构域、4个整合素-表皮生长因子结构域(I-EGF1、I-EGF2、I-EGF3、I-EGF4)、β-尾、跨膜和胞内结构域。术语β1整合素涵盖了“全长”未处理的β1整合素,以及由细胞中的加工所产生的β1整合素的任何形式或其任何片段。术语β1整合素还涵盖了β1整合素的天然存在的变体,如SNP变体、剪接变体和等位变体。作为异源二聚体与α5结合的β1整合素在本领域中已知与一些配体(例如,纤连蛋白)相互作用,并且这种相互作用导致蛋白构象变化和信号转导,从而导致细胞活动,如细胞粘附、增殖、细胞凋亡、迁移和吞噬的变化。以下提供了人β1整合素的全长氨基酸序列(示例性信号序列＝斜体文本;示例性胞外结构域＝加下划线的文本)：

[0034] *MNLQPIFWIGLISSVCCVFA*QTDENRCLKANAKSCGECIQAGPNCGWCTNSTFLQ
EGMPTSARCDDLEALKKKGCPPDDIENPRGSKDIKKNKNVTNRSKGTAEKLKPEDIT
QIQPQQLVLRLRSGEPQTFTLKFKRAEDYPIDLYYLMDLSYSMKDDLENVKSLGTDL
MNEMRRITSDFRIGFGSFVEKTVMPYISTTPAKLRNPCTSEQNCTSPFSYKNVLSLTN
KGEVFNELVGKQRISGNLDSPEGGFDAIMQVAVCGSLIGWRNVTRLLVFSTDAGFHF
AGDGKLGGIVLPNDGQCHLENNMYTMSHYYDYPSIAHLVQKLSENNIQTIFAVTEEF
QPVYKELKNLIPKSAVGTLSANSSNVIQLIIDAYNSLSSEVILENGKLSEGVTISYKSYC
KNGVNGTGENGRKCSNISIGDEVQFEISITSNKCPKKDSDSFKIRPLGFTEEVEVILQYI
CECECQSEGIPESPKCHEGNGTFECGACRCNEGRVGRHCECSTDEVNSEDMDAYCR
KENSSEICSNNGECVCGQCVCRKRDNTNEIYSGKFCECDNFNCDRSNGLICGGNGVC
KCRVCECNPNYTGSACDCSLDTSTCEASNGQICNGRGICECGVCKCTDPKFQGQTCE
MCQTCLGVCAEHKECVQCRAFNKGEKKDTCTQECSYFNITKVESRDKLPQPVQPDP
VSHCKEKDVDDCWFYFTYSVNGNNEVMVHVVENPECPTGPDIIPIVAGVVAGIVLIG
LALLLIWKLLMIIHDRREFAKFEKEKMNAKWDTGENPIYKSAVTTVVNPKYEGK
（SEQ ID NO：113）。

[0035] 以下提供了小鼠β1整合素的全长氨基酸序列(示例性信号序列＝斜体文本;示例性胞外结构域＝加下划线的文本)：

[0036] *MNLQLVSWIGLISLICSVFG*QTDKNRCLKANAKSCGECIQAGPNCGWCTNTTFLQ
EGMPTSARCDDLEALKKKGCQPSDIENPRGSQTIKKNKNVTNRSKGMAEKLRPEDIT
QIQPQQLLLKLRSGEPQKFTLKFKRAEDYPIDLYYLMDLSYSMKDDLENVKSLGTDL
MNEMRRITSDFRIGFGSFVEKTVMPYISTTPAKLRNPCTSEQNCTSPFSYKNVLSLTD
RGEFFNELVGQQRISGNLDSPEGGFDAIMQVAVCGSLIGWRNVTRLLVFSTDAGFHF
AGDGKLGGIVLPNDGQCHLENNVYTMSHYYDYPSIAHLVQKLSENNIQTIFAVTEEF
QPVYKELKNLIPKSAVGTLSGNSSNVIQLIIDAYNSLSSEVILENSKLPDGVTINYKSY
CKNGVNGTGENGRKCSNISIGDEVQFEISITANKCPNKESETIKIKPLGFTEEVEVVLQ
FICKCNCQSHGIPASPKCHEGNGTFECGACRCNEGRVGRHCECSTDEVNSEDMDAY
CRKENSSEICSNNGECVCGQCVCRKRDNTNEIYSGKFCECDNFNCDRSNGLICGGNG
VCRCRVCECYPNYTGSACDCSLDTGPCLASNGQICNGRGICECGACKCTDPKFQGPT
CETCQTCLGVCAEHKECVQCRAFNKGEKKDTCAQECSHFNLTKVESREKLPQPVQV
DPVTHCKEKDIDDCWFYFTYSVNGNNEAIVHVVETPDCPTGPDIIPIVAGVVAGIVLI
GLALLLIWKLLMIIHDRREFAKFEKEKMNAKWDTGENPIYKSAVTTVVNPKYEGK
（SEQ ID NO：114）。

[0037] 除非另外说明,否则术语“α4整合素”、“CD49d”或“α4整合素多肽”和类似术语是指来自任何脊椎动物来源,包括哺乳动物,如灵长类动物(例如,人、食蟹猴(cyno))、狗和啮齿类(例如,小鼠和大鼠)的多肽(“多肽”和“蛋白”在本文中是可互换使用的)或者任何天然α4整合素。α4整合素,在本领域中也被称为整合素α-4、ITGA4蛋白、CD49d、VLA-4亚基α,具有多个结构域,包括β-螺旋桨(例如,具有7个60个氨基酸的FG-GAP重复)、thigh、genu、calf1、calf2、跨膜和胞内结构域并且还具有3个钙结合位点。术语α4整合素涵盖了“全长”未处理的α4整合素,以及由细胞中的加工所产生的α4整合素的任何形式或其任何片段。术语α4整合素还涵盖了α4整合素的天然存在的变体,如SNP变体、剪接变体和等位变体。作为异源二聚体与β1结合的α4整合素在本领域中已知与一些配体(例如,VCAM1、纤连蛋白)相互作用,并且这种相互作用导致蛋白构象变化和信号转导,从而导致细胞活动,如细胞粘附、增殖、迁移和吞噬的变化。以下提供了人α4整合素的全长氨基酸序列(示例性信号序列＝斜体文本;示例性胞外结构域＝加下划线的文本)：

[0038] *MAWEARREPGPRRAAVRETVMLLLCLGVPTGRP*YNVDTESALLYQGPHNTLFGYS
VVLHSHGANRWLLVGAPTANWLANASVINPGAIYRCRIGKNPGQTCEQLQLGSPNG
EPCGKTCLEERDNQWLGVTLSRQPGENGSIVTCGHRWKNIFYIKNENKLPTGGCYGV
PPDLRTELSKRIAPCYQDYVKKFGENFASCQAGISSFYTKDLIVMGAPGSSYWTGSLF
VYNITTNKYKAFLDKQNQVKFGSYLGYSVGAGHFRSQHTTEVVGGAPQHEQIGKAY
IFSIDEKELNILHEMKGKKLGSYFGASVCAVDLNADGFSDLLVGAPMQSTIREEGRVF
VYINSGSGAVMNAMETNLVGSDKYAARFGESIVNLGDIDNDGFEDVAIGAPQEDDLQ
GAIYIYNGRADGISSTFSQRIEGLQISKSLSMFGQSISGQIDADNNGYVDVAVGAFRSD
SAVLLRTRPVVIVDASLSHPESVNRTKFDCVENGWPSVCIDLTLCFSYKGKEVPGYIV
LFYNMSLDVNRKAESPPRFYFSSNGTSDVITGSIQVSSREANCRTHQAFMRKDVRDIL
TPIQIEAAYHLGPHVISKRSTEEFPPLQPILQQKKEKDIMKKTINFARFCAHENCSADL
QVSAKIGFLKPHENKTYLAVGSMKTLMLNVSLFNAGDDAYETTLHVKLPVGLYFIKI
LELEEKQINCEVTDNSGVVQLDCSIGYIYVDHLSRIDISFLLDVSSLSRAEEDLSITVHA
TCENEEEMDNLKHSRVTVAIPLKYEVKLTVHGFVNPTSFVYGSNDENEPETCMVEKM
NLTFHVINTGNSMAPNVSVEIMVPNSFSPQTDKLFNILDVQTTTGECHFENYQRVCAL
EQQKSAMQTLKGIVRFLSKTDKRLLYCIKADPHCLNFLCNFGKMESGKEASVHIQLE
GRPSILEMDETSALKFEIRATGFPEPNPRVIELNKDENVAHVLLEGLHHQRPKRYFTIVI
ISSSLLLGLIVLLLISYVMWKAGFFKRQYKSILQEENRRDSWSYINSKSNDD（SEQ ID
NO：115）。

[0039] 除非另外说明，否则术语“纤连蛋白”或“FN”和类似术语是指来自任何脊椎动物来源，包括哺乳动物，如灵长类动物(例如，人、食蟹猴(cyno))、狗和啮齿类(例如，小鼠和大鼠)的多肽(“多肽”和“蛋白”在本文中是可互换使用的)或者任何天然纤连蛋白。纤连蛋白作为通过二硫键连接的二聚体或多聚体存在，并且具有主要由被称为FN-I、FN-II和FN-III的三个不同重复所组成的多模块结构。在二聚体形式中，两个纤连蛋白亚基中的每一个分别由12个FN-I、2个FN-II和15至17个FN-III模块组成。术语纤连蛋白还涵盖了纤连蛋白天然存在的变体，如SNP变体、剪接变体和等位变体。纤连蛋白是胞外基质的主要组分，并且具有多个蛋白结合结构域，包括用于纤维蛋白-结合、胶原蛋白-结合、腓骨蛋白-1-结合、肝素-结合和粘结蛋白聚糖-结合的结构域。纤连蛋白在本领域中已知与整合素相互作用(例如，经由RGD)并且是α5β1整合素、α8β1整合素和αvβ3整合素的配体。以下提供了人纤连蛋白的全长氨基酸序列(示例性信号序列＝斜体文本)：

[0040] *MLRGPGPGLLLLAVQCLGTAVPSTGASKSKR*QAQQMVQPQSPVAVSQSKPGCYD
NGKHYQINQQWERTYLGNALVCTCYGGSRGFNCESKPEAEETCFDKYTGNTYRVG
DTYERPKDSMIWDCTCIGAGRGRISCTIANRCHEGGQSYKIGDTWRRPHETGGYMLE
CVCLGNGKGEWTCKPIAEKCFDHAAGTSYVVGETWEKPYQGWMMVDCTCLGEGS
GRITCTSRNRCNDQDTRTSYRIGDTWSKKDNRGNLLQCICTGNGRGEWKCERHTSV
QTTSSGSGPFTDVRAAVYQPQPHPQPPPYGHCVTDSGVVYSVGMQWLKTQGNKQM
LCTCLGNGVSCQETAVTQTYGGNSNGEPCVLPFTYNGRTFYSCTTEGRQDGHLWCS
TTSNYEQDQKYSFCTDHTVLVQTRGGNSNGALCHFPFLYNNHNYTDCTSEGRRDN

[0041] MKWCGTTQNYDADQKFGFCPMAAHEEICTTNEGVMYRIGDQWDKQHDMGHMMR
CTCVGNGRGEWTCIAYSQLRDQCIVDDITYNVNDTFHKRHEEGHMLNCTCFGQGRG
RWKCDPVDQCQDSETGTFYQIGDSWEKYVHGVRYQCYCYGRGIGEWHCQPLQTYP
SSSGPVEVFITETPSQPNSHPIQWNAPQPSHISKYILRWRPKNSVGRWKEATIPGHLNS
YTIKGLKPGVVYEGQLISIQQYGHQEVTRFDFTTTSTSTPVTSNTVTGETTPFSPLVAT
SESVTEITASSFVVSWVSASDTVSGFRVEYELSEEGDEPQYLDLPSTATSVNIPDLLPG
RKYIVNVYQISEDGEQSLILSTSQTTAPDAPPDTTVDQVDDTSIVVRWSRPQAPITGY
RIVYSPSVEGSSTELNLPETANSVTLSDLQPGVQYNITIYAVEENQESTPVVIQQETTG
TPRSDTVPSPRDLQFVEVTDVKVTIMWTPPESAVTGYRVDVIPVNLPGEHGQRLPISR
NTFAEVTGLSPGVTYYFKVFAVSHGRESKPLTAQQTTKLDAPTNLQFVNETDSTVLV
RWTPPRAQITGYRLTVGLTRRGQPRQYNVGPSVSKYPLRNLQPASEYTVSLVAIKGN
QESPKATGVFTTLQPGSSIPPYNTEVTETTIVITWTPAPRIGFKLGVRPSQGGEAPREV
TSDSGSIVVSGLTPGVEYVYTIQVLRDGQERDAPIVNKVVTPLSPPTNLHLEANPDTG
VLTVSWERSTTPDITGYRITTTPTNGQQGNSLEEVVHADQSSCTFDNLSPGLEYNVSV
YTVKDDKESVPISDTIIPEVPQLTDLSFVDITDSSIGLRWTPLNSSTIIGYRITVVAAGEG
IPIFEDFVDSSVGYYTVTGLEPGIDYDISVITLINGGESAPTTLTQQTAVPPPTDLRFTNI
GPDTMRVTWAPPPSIDLTNFLVRYSPVKNEEDVAELSISPSDNAVVLTNLLPGTEYVV
SVSSVYEQHESTPLRGRQKTGLDSPTGIDFSDITANSFTVHWIAPRATITGYRIRHHPE
HFSGRPREDRVPHSRNSITLTNLTPGTEYVVSIVALNGREESPLLIGQQSTVSDVPRDL
EVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGV
DYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEIDKPSQMQVTDVQDNSISVKWLPSSSPVTG
YRVTTTPKNGPGPTKTKTAGPDQTEMTIEGLQPTVEYVVSVYAQNPSGESQPLVQTA
VTNIDRPKGLAFTDVDVDSIKIAWESPQGQVSRYRVTYSSPEDGIHELFPAPDGEEDT
AELQGLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGTQSTAIPAPTDLKFTQVTPTSLSAQWTP
PNVQLTGYRVRVTPKEKTGPMKEINLAPDSSSVVVSGLMVATKYEVSVYALKDTLT
SRPAQGVVTTLENVSPPRRARVTDATETTITISWRTKTETITGFQVDAVPANGQTPIQ
RTIKPDVRSYTITGLQPGTDYKIYLYTLNDNARSSPVVIDASTAIDAPSNLRFLATTPN
SLLVSWQPPRARITGYIIKYEKPGSPPREVVPRPRPGVTEATITGLEPGTEYTIYVIALK
NNQKSEPLIGRKKTDELPQLVTLPHPNLHGPEILDVPSTVQKTPFVTHPGYDTGNGIQ
LPGTSGQQPSVGQQMIFEEHGFRRTTPPTTATPIRHRPRPYPPNVGEEIQIGHIPREDVD
YHLYPHGPGLNPNASTGQEALSQTTISWAPFQDTSEYIISCHPVGTDEEPLQFRVPGTS
TSATLTGLTRGATYNVIVEALKDQQRHKVREEVVTVGNSVNEGLNQPTDDSCFDPY
TVSHYAVGDEWERMSESGFKLLCQCLGFGSGHFRCDSSRWCHDNGVNYKIGEKWD
RQGENGQMMSCTCLGNGKGEFKCDPHEATCYDDGKTYHVGEQWQKEYLGAICSC
TCFGGQRGWRCDNCRRPGGEPSPEGTTGQSYNQYSQRYHQRTNTNVNCPIECFMPL
DVQADREDSRE (SEQ ID NO: 116) 。

[0042] 如本文所使用的,术语“结合剂”或其语法等价形式是指具有结合抗原的一个或多个抗原结合位点的分子(例如,抗体)。在一些实施方式中,如本文所描述的α5β1整合素结合剂是结合至α5β1整合素,如人α5β1整合素的抗体、抗体片段或其它肽-基分子。

[0043] 术语“抗体”、“免疫球蛋白”或“Ig”在本文中是可互换使用的并且以最广泛的含义使用并且具体地覆盖(例如)多克隆抗体、单克隆抗体(包括激动剂、拮抗剂、中和抗体、全长单克隆抗体)、具有多表位或单表位特异性的抗体组合物、重组产生的抗体、单特异性抗体、多重特异性抗体(包括双重特异性抗体)、合成抗体、嵌合抗体、人源化抗体或者具有全长重链和/或轻链的抗体的人形式。本发明公开还包括保留α5整合素结合特征的抗体片段(和/或包含抗体片段的多肽)。抗体片段的非限制性实例包括抗体的抗原-结合区和/或效应区,例如,Fab、Fab'、F(ab')$_2$、Fv、scFv、(scFv)$_2$、单链抗体分子、双重可变区抗体、单可变区抗体、线性抗体、V区、由抗体片段形成的多重特异性抗体、F(ab)$_2$、Fd、Fc、双链抗体、二-双链抗体、二硫键连接的Fv(dsFv)、单域抗体(例如,VHH、纳米抗体)或其它片段(例如,由非共价键偶联的重链和轻链的可变区组成的片段)。一般来说,可变区结构域可以是免疫球蛋白重

(VH)和/或轻(VL)可变区的任何适合的布置。例如,本发明公开还包括包含两个重链和两个轻链分子,抗体轻链单体和抗体重链单体的四聚体抗体。因此,例如,可变区结构域可以是二聚的并且含有结合α5整合素的VH-VH、VH-VL或VL-VL二聚体。如果需要,VH和VL链可以直接或通过接头共价偶联以形成单链Fv(scFv)。为了便于提及,在本文中将scFv蛋白称为包括在“抗体片段”类中。抗体片段的另一种形式是包含抗体的一个或多个互补决定区(CDR)的肽。可以通过构建编码所关心的CDR的多核苷酸获得CDR(也称为“最小识别单元”或“高变区”)。例如,使用产生抗体的细胞的mRNA作为模板,通过使用聚合酶链反应合成可变区来制备这些多核苷酸(参见,例如,Larrick等人,Methods:A Companion to Methods in Enzymology,2:1 06(1991);Courtenay-Luck,“GeneticManipulation of Monoclonal Antibodies.”in Monoclonal Antibodies Production.Engineering and Clinical Application,Ritter等人(主编),第166页,Cambridge University Press(1995);和Ward等人,“Genetic Manipulation and Expression of Antibodies,”inMonoclonal Antibodies:Principles and Applications,Birch等人,(主编),第137页,Wiley-Liss,Inc.(1995))。可以将抗体片段引入单域抗体、大抗体(maxibody)、微抗体、胞内抗体、双链抗体、三链抗体、四链抗体、新抗原受体的可变域(v-NAR)和双-单链Fv区(参见,例如,Hollinger and Hudson,Nature Biotechnology,23(9):1 126-1136,2005)。在一些实施方式中,所示结合剂含有轻链和/或重链恒定区,如一个或多个恒定区,包括一个或多个IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4恒定区。在一些实施方式中,抗体可以包括任何上述的表位-结合片段。本文所述的抗体可以是免疫球蛋白分子的任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)或任何亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。抗体可以是α5β1结合抗体,包括拮抗性抗体或激动性抗体。

[0044] 当用于表示结合剂(例如,抗体)时,如本文所使用的术语“单特异性”是指具有分别结合至相同抗原的相同表位的一个或多个结合位点的结合剂。

[0045] 当用于表示结合剂(例如,抗体)时,术语“双重特异性”表示所述结合剂能够特异性结合至至少两种不同的抗原决定簇,例如,分别通过结合至不同抗原或结合至相同抗原上的不同表位的一对抗体重链可变域(VH)和抗体轻链可变域(VL)所形成的两个结合位点。这种双重特异性结合剂(例如,抗体)可以具有1+1形式。其它双重特异性结合剂(例如,抗体)形式可以是2+1或1+2形式(包含第一抗原或表位的两个结合位点和第二抗原或表位的一个结合位点)或者2+2形式(包含第一抗原或表位的两个结合位点和第二抗原或表位的两个结合位点)。当双重特异性结合剂(例如,抗体)包含两个抗原结合位点时,每个可以结合至不同的抗原决定簇。这种双重特异性结合剂(例如,抗体)可以结合至相同抗原上(例如,α5β1整合素上的表位)或者不同抗原上(例如,α5β1整合素上的表位和αvβ1整合素上的表位)的两个不同表位。

[0046] 在两条或更多条核酸或多肽的背景中,术语“同一的”或百分比“同一性”是指当出于最大对应性进行比较和比对(如有必要,引入缺口)时,不考虑作为序列同一性的一部分的任何保守氨基酸替换,相同或具有所指明的百分比的相同核苷酸或氨基酸残基的两条或更多条序列或子序列。可以使用序列比较软件或算法或者通过目视检查测量百分比同一性。可以用于获得氨基酸或核苷酸序列比对的多种算法和软件在本领域中是熟知的。这些包括(但不限于)BLAST、ALIGN、Megalign、BestFit、GCG Wisconsin软件包及其变化形式。在

一些实施方式中,两条核酸或多肽基本相同,这表示如使用序列比较算法或通过目视检查所测量的,当出于最大对应性进行比较和比对时,它们具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%,并且在一些实施方式中,至少95%、96%、97%、98%、99%的核苷酸或氨基酸残基同一性。在一些实施方式中,在长度至少约10个残基,至少约20个残基,至少约40-60个残基,至少约60-860个残基或它们之间的任何整数值的氨基酸序列区域内存在同一性。在一些实施方式中,在大于60-80个残基,如至少约80-100个残基的区域内存在同一性,并且在一些实施方式中,序列在所比较的序列全长(如靶标蛋白或抗体的编码区)上基本相同。在一些实施方式中,在长度至少约10个碱基,至少约20个碱基,至少约40-60个碱基,至少约60-80个碱基或它们之间的任何整数值的核苷酸序列区域内存在同一性。在一些实施方式中,在大于60-80个碱基,如至少约80-1000个碱基或更多个碱基的区域内存在同一性,并且在一些实施方式中,序列在所比较的序列全长(如编码所关心的蛋白的核苷酸序列)上基本相同。

[0047] “保守氨基酸替换”是其中一个氨基酸残基被具有带类似化学特性的侧链的另一个氨基酸残基替换的替换。在本领域中一般地定义了具有类似侧链的氨基酸残基家族,所述侧链包括碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,门冬氨酸、谷氨酸)、不带电的极性侧链(例如,甘氨酸、天门冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、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、蛋氨酸、色氨酸)、β-支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳烃侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。例如,酪氨酸对苯丙氨酸的替换是保守替换。一般地,本发明公开的多肽、可溶性蛋白和/或抗体序列中的保守替换不消除含有所述氨基酸序列的多肽、可溶性蛋白和/或抗体与靶标结合位点的结合。识别不消除结合的氨基酸保守替换的方法在本领域中是熟知的。

[0048] 术语“多肽”是指具有任何长度的氨基酸的聚合物。所述聚合物可以是直链或支链的,它可以包含修饰的氨基酸,并且它可以包括非氨基酸(例如,被非氨基酸中断)。该术语还涵盖已天然或通过干预修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或者任何其它操作或修饰,如(直接或间接)连接至或缀合至部分,如标签组分。例如,含有氨基酸的一种或多种类似物(包括,例如,非天然氨基酸)以及本领域中已知的其它修饰的多肽也包括在该定义内。应理解由于本发明公开的多肽可以基于抗体或免疫球蛋白超家族的其它成员,因此在一些实施方式中,所述多肽可以作为单链存在。

[0049] 如本文所使用的,“抗原”是含有结合剂(例如,抗体)可以结合的表位的部分或分子。照此,可以通过抗体结合抗原。在一些实施方式中,本文所描述的结合剂(例如,抗体)结合的抗原是α5β1整合素(例如,人α5β1整合素)或其片段。

[0050] 如本文所使用的,“表位”是本领域中的术语并且是指抗体可以与之结合的抗原的局部区域。表位可以是线性表位或构象、非线性或不连续的表位。就多肽抗原来说,例如,表位可以是多肽的邻接氨基酸(“线性”表位)或者表位可以包含来自多肽的两个或更多个邻接区域的氨基酸(“构象”、“非线性”或“不连续”表位),例如,人α5β1整合素。本领域技术人员将理解通常,线性表位可以或可以不依赖于二级、三级或四级结构。例如,在一些实施方式中,抗体结合至一组氨基酸,而不考虑它们是否以天然立体蛋白质结构折叠。在其它实施方式中,为了识别和结合所述表位,抗体需要氨基酸残基组成表位以显示出具体构象(例

如,弯曲、扭转、转角或折叠)。

[0051] 当两个抗体识别三维空间中相同、重叠或相邻的表位时,抗体结合“表位”或与参考抗体“基本相同的表位”或“相同的表位”。用于确定两个抗体是否结合至三维空间中相同、重叠或相邻表位的最广泛使用且快速的方法是竞争测定,其可以以一些不同形式配置,例如,使用标记抗原或标记抗体。在一些测定中,将抗原固定化在96-孔板上,或者在细胞表面上表达,并且使用放射性、荧光或酶标签测量未标记抗体阻断标记抗体的结合的能力。

[0052] “表位框并法(epitope binning)”是基于它们所识别的表位对抗体分组的方法。更具体地,表位框并法包括(例如)使用竞争测定来区分不同抗体的表位识别性质的方法和系统。这些测定可以与基于它们的表位识别性质对抗体聚类并识别具有不同结合特异性的抗体的计算过程组合。

[0053] 在抗体背景中,如本文所使用的,术语“特异性结合”、“特异性识别”、“免疫特异性结合”、“选择性结合”、“免疫特异性识别”和“免疫特异的”是类似术语,并且表示结合至抗原(例如,表位)的分子,照此本领域技术人员理解结合。在一些实施方式中,“特异性结合”表示,例如,多肽或分子以比替代物质,包括相关或无关蛋白更频繁、更快速、以更长持续时间、以更大亲和力或者以上述一些组合与表位、蛋白或靶标分子相互作用。例如,特异性结合至抗原的分子可以结合至其它肽或多肽,一般地以较低的亲和力,如通过(例如)免疫测定、Biacore™、KinExA 3000仪(Sapidyne Instruments,Boise,ID)或者本领域中已知的其它测定所确定的。在一些实施方式中,如使用实验技术,如放射免疫测定(RIA)和酶联免疫吸附测定(ELISA)所确定的,当它以高于任何可交叉反应的抗原的亲和力结合至抗原时,抗体或抗原结合结构域结合至或特异性结合至抗原。通常,特异性或选择性反应将是背景信号或噪音的至少两倍并且可以是背景的大于10倍。有关结合特异性的讨论,参见,例如,Fundamental Immunology 332-36(Paul主编,第2版.1989)。在一些实施方式中,抗体或抗原结合结构域与“非靶标”蛋白的结合程度是所述抗体或抗原结合结构域与其特定靶标抗原的结合的小于约10%,例如,如通过荧光激活细胞分选术(FACS)分析或RIA所确定的。在一些实施方式中,特异性结合至抗原的分子以比当所述分子结合至另一种抗原时的Ka大至少2log、2.5log、3log、4log或以上的Ka结合至所述抗原。在一些实施方式中,特异性结合至抗原的分子不与其它蛋白交叉反应。在一些实施方式中,特异性结合至抗原的分子不与其它非α5β1整合素蛋白交叉反应。在一些实施方式中,“特异性结合”是指(例如)多肽或分子以约0.1mM或以下的K_D,但是更通常小于约1μM的K_D结合蛋白或靶标。在一些实施方式中,“特异性结合”是指多肽或分子以至少约0.1μM或以下,至少约0.01μM或以下或者至少约1nM或以下的K_D结合靶标。由于不同物种中同源蛋白之间的序列同一性,特异性结合可以包括识别不止一种物种中的蛋白或靶标的多肽或分子。同样地,由于不同蛋白的多肽序列的某些区域内的同源性,特异性结合可以包括识别不止一种蛋白或靶标的多肽或分子。应理解,在一些实施方式中,特异性结合第一靶标的多肽或分子可以或可以不特异性结合第二靶标。照此,“特异性结合”不必须要求(尽管它可以包括)排他的结合,例如,结合至单个靶标。因此,在一些实施方式中,多肽或分子可以特异性结合不止一种靶标。在一些实施方式中,可以通过多肽或分子上的相同抗原结合位点结合多个靶标。例如,在某些情况下,抗体可以包含两个相同的抗原结合位点,它们中的每一个特异性结合两种或更多种蛋白上的相同表位。在一些替代实施方式中,抗体可以是双重特异性的并且包含至少两个具有不同特异性

的抗原结合位点。一般地,但不必需,提及“结合”表示“特异性结合”。

[0054] “结合亲和力”一般地表示分子单一结合位点(例如,结合蛋白,如抗体)及其结合伴侣(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和强度。除非另外说明,否则如本文所使用的,“结合亲和力”是指固有结合亲和力,其反映结合对(例如,抗体和抗原)成员之间的1:1相互作用。一般地,可以通过解离常数(K_D)表示结合分子X对其结合伴侣Y的亲和力。可以通过本领域中已知的常见方法测量亲和力,包括本文所描述的那些方法。低-亲合力抗体通常缓慢结合抗原并且往往容易解离,然而高-亲合力抗体通常更快速结合抗原并且往往保持更长的结合。测量结合亲合力的多种方法在本领域中是已知的,它们中的任一种可以用于本发明公开的目的。在一个实施方式中,可以使用(例如)OctetQK384 sytem(ForteBio,Menlo Park,CA)通过生物膜干涉测量法(BLI)测量“K_D”或“K_D值”。作为另外一种选择,还可以在放射性标记的抗原结合测定(RIA)中测量K_D,例如,使用所关心的抗体的Fab形式及其抗原进行(Chen等人,(1999)J.Mol Biol293:865-881)或者使用(例如)BIAcoreTM-2000或BIAcoreTM-3000BIAcore,Inc.,Piscataway,NJ,通过Biacore使用表面等离子共振(SPR)测定进行。还可以分别使用(例如)OctetQK384 sytem(ForteBio,Menlo Park,CA)或者BIAcoreTM-2000或者BIAcoreTM-3000(BIAcore,Inc.,piscataway,NJ),通过以上所描述的相同SPR或BLI技术确定“结合速率(on-rate、rate ofassociation或association rate)或“k_{on}”和“解离速率”(off-rate、rate of dissociation或dissociation rate)或“k_{off}”。

[0055] 当在α5β1整合素结合剂(例如,抗体)的背景中使用时,术语“竞争”表示竞争靶标上相同表位或结合位点的结合剂,其包括这些结合剂之间的竞争,如通过其中正在研究中的结合剂防止或抑制参考分子(例如,参考配体,或者参考抗原结合蛋白,如参考抗体)与共同抗原(例如,α5β1整合素)的特异性结合的测定所确定的。多种类型的竞争性结合测定可以用于确定测试结合剂是否与参考分子竞争与α5β1整合素(例如,人α5β1整合素)结合。可以使用的测定的实例包括固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA),夹心竞争测定(参见,例如,Stahli等人,(1983)Methods in Enzymology 9:242-253);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见,例如,Kirkland等人,(1986)J.Immunol.137:3614-3619)、固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(参见,例如,Harlow and Lane,(1988)Antibodies,A Laboratory Manual,ColdSpring Harbor Press);使用1-125标记的固相直接标记RIA(参见,例如,Morel等人,(1988)Molec.Immunol.25:7-15);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见,例如,Cheung等人,(1990)Virology 176:546-552);和直接标记的RIA(Moldenhauer等人,(1990)Scand.J.Immunol.32:77-82)。通常,这种测定包括结合至具有未标记的测试抗原结合蛋白(例如,测试α5β1整合素抗体)或者标记的参考抗原结合蛋白(例如,参考α5β1整合素抗体)中任一个的固体表面或细胞的纯化抗原(例如,α5β1整合素,如人α5β1整合素)的使用。可以在存在测试抗原结合蛋白的情况下,通过确定结合至固体表面或细胞的标记的量来测量竞争性抑制。通常,测试抗原结合蛋白过量存在。通过竞争测定(竞争抗体)识别的抗体包括结合至与参考抗体相同的表位的抗体和/或结合至对于发生空间位阻来说,与参考抗体结合的表位足够邻近的相邻表位(例如,类似表位或者重叠表位)的抗体。本文描述了有关确定竞争性结合的方法的其它详细信息,如实施例6所示。通常,当竞争抗体过量存在时,它将参考抗体与共同抗原的特异性结合抑制至少20%,例如,至少20%、25%、30%、35%、40%、

45％、50％、55％、60％、65％、70％或75％。在一些实例中，将结合抑制了至少80％、85％、90％、95％、96％或97％、98％、99％或以上。

[0056] 如本文所使用的，术语“恒定区”或“恒定域”是本领域熟知的抗体术语并且是指抗体部分，例如，不直接参与抗体与抗原的结合，但是可以显示出多种效应因子功能，如与Fc受体相互作用的轻链和/或重链的羧基末端部分。该术语包括通常相对于免疫球蛋白可变域具有更保守的氨基酸序列的免疫球蛋白分子的一部分。

[0057] 抗体“效应因子功能”表示可归因于抗体Fc区(例如，天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)并且随抗体同种型改变的那些生物学活性。抗体效应功能的实例包括：C1q结合和补体依赖性细胞毒性；Fc受体结合；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)；吞噬；细胞表面受体(例如，B细胞受体)下调；和B细胞激活。

[0058] 在本文中，术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C末端区，其包括(例如)天然序列Fc区、重组Fc区和变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可能不同，但是通常定义人IgG重链Fc区以从位置Cys226(根据EU编号系统)或Pro230(根据EU编号系统)处的氨基酸残基延伸至其羧基末端。例如，可以在抗体的产生或纯化期间或者通过重组工程设计编码抗体重链的核酸来除去Fc区的C末端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)。以下提供了示例性Fc区序列(CH2域＝加粗文本；CH3域＝加下划线文本)：

[0059] CPPCP**APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAK**GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK（SEQ ID NO：133）。

[0060] “功能性Fc区”具有天然序列Fc区的“效应因子功能”。示例性“效应功能”包括C1q结合；补体依赖性细胞毒性(CDC)；Fc受体结合；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)；吞噬；细胞表面受体(例如，B细胞受体；BCR)下调等。这些效应因子功能通常需要Fc区与结合区或结合域(例如，抗体可变区或域)组合并且可以使用如所公开的多种测定评价。

[0061] “天然序列Fc区”包含与天然存在的Fc区的氨基酸序列相同，且未被人操纵、修饰和/或改变(例如，分离、纯化、选择、包括或与其它序列，如可变区序列组合)的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括天然序列人IgG1 Fc区(非A和A同种异型)；天然序列人IgG2 Fc区；天然序列人IgG3 Fc区；和天然序列人IgG4 Fc区及其天然存在的变体。图3中显示了示例性IgG1和IgG4 Fc序列。

[0062] “变体Fc区”包含借助于至少一种氨基酸修饰(例如，替换、添加或缺失)，优选地一种或多种氨基酸替换而不同于天然序列Fc区的氨基酸序列。在一些实施方式中，与天然序列Fc区或亲代多肽的Fc区相比，变体Fc区在天然序列Fc区中或者在亲代多肽的Fc区中具有至少一个氨基酸替换，例如，约1至约10个氨基酸替换，并且优选地约1至约5个氨基酸替换。本文所描述的变体Fc区可以与天然序列Fc区和/或亲代多肽的Fc区具有至少约80％的同源性，或者与之具有至少约90％的同源性，例如，与之具有至少约95％的同源性。在本文中，本文所描述的变体Fc区可以具有效应因子功能丧失(例如，沉默Fc)。以下提供了示例性变体Fc区(“沉默Fc”)序列(CH2域＝加粗文本，其中对氨基酸变化加下划线；CH3域＝加下划线文本)：

[0063] CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 134)。图3中显示了示例性变体Fc序列,包括以下变体(根据EU编号系统):N297A/Q(N297A或N297Q)、LALA(L234A、L235A)、LALAPS(L234A、L235A、P331S)、LALAPG(L234A、L235A、P329G)和TM(L234F、L235E、P331S)。

[0065] 当用于表示抗体时,如本文所使用的,术语"重链"是指约50-70kD的多肽链,其中氨基-末端部分包括约120至130个或更多个氨基酸的可变区,并且羧基-末端部分包括一个或多个恒定区。基于恒定结构域氨基酸序列,"重链"可以表示任何不同类型,例如,α(α)、δ(δ)、ε(ε)、γ(γ)和μ(μ),其分别产生了IgA、IgD、IgE、IgG和IgM类抗体,包括IgG亚类,例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0066] 当用于表示抗体时,如本文所使用的,术语"轻链"可以表示约25kDa的多肽链,其中氨基-末端部分包括约100至约110个或更多个氨基酸的可变区,并且羧基-末端部分包括恒定区。轻链的大致长度为211至217个氨基酸。基于恒定结构域的氨基酸序列,存在两种不同的类型,例如,K或λ。轻链氨基酸序列在本领域中是熟知的。

[0067] 术语"抗原结合片段"、"抗原结合域"、"抗原结合区"以及类似术语表示包含与抗原相互作用的氨基酸残基并且赋予结合片段、域或区对抗原的特异性和亲合力的抗体部分(例如,CDR)。如本文所使用的"抗原结合片段"包括"抗体片段",其包含包括一个或多个CDR,如抗体的抗原结合或可变区的抗体部分。

[0068] 本文所述的抗体包括(但不限于)合成抗体、单克隆抗体、重组产生的抗体、多重特异性抗体(例如,包括双重特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、胞内抗体、单-链Fvs(scFv)(例如,包括单特异性、双重特异性等)、骆驼化抗体、Fab片段、F(ab′)片段、二硫键-连接的Fv(sdFv)、抗-独特型(抗-Id)抗体和任何上述抗体的表位-结合片段。

[0069] 在一些实施方式中,本文所述的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,包括含有结合至α5β1整合素抗原的一个或多个抗原结合位点的分子。

[0070] 抗体可以是任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY)、任何类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1或IgA2)或任何亚类(例如,IgG2a或IgG2b)的免疫球蛋白分子。在一些实施方式中,本文所述的抗体是IgG抗体(例如,人IgG),或其类(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)或亚类。

[0071] 在一些实施方式中,抗体是包含两条重(H)链/轻(L)链对的4-链抗体单元,其中H链的氨基酸序列是相同的并且L链的氨基酸序列是相同的。在一些实施方式中,H和L链包含恒定区,例如,人恒定区。在一些实施方式中,这些抗体的L链恒定区是kappa或lambda轻链恒定区,例如,人kappa或lambda轻链恒定区。在一些实施方式中,这些抗体的H链恒定区包含gamma重链恒定区,例如,人gamma重链恒定区。在一些实施方式中,这些抗体包含IgG恒定区,例如,人IgG恒定区(例如,IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4恒定区)。

[0072] 抗体或其片段可以优先结合至α5β1整合素,如人α5β1整合素,这表示抗体或其片段以大于它结合至无关对照蛋白时的亲和力结合α5β1整合素,和/或以大于它结合至无关对照蛋白时的亲和力结合人α5β1整合素。例如,所述抗体或其片段可以特异性识别并结合α5β1整合素或其部分。"特异性结合"表示所述抗体或其片段以比对于无关对照蛋白(例如,

鸡蛋清溶菌酶)的亲和力大至少5、10、15、20、25、50、100、250、500、1000或10,000倍的亲和力结合至α5β1整合素。在一些实施方式中,所述抗体或其片段可以基本仅结合α5β1整合素(例如,借助于(例如)结合亲和力可测量的差异,能够区分α5β1整合素和其它已知的多肽)。在一些实施方式中,α5β1整合素结合剂(例如,抗体)可以与除人α5β1整合素序列以外的α5β1整合素序列(例如,食蟹猴α5β1整合素序列)反应。

[0073] 术语“可变区”或“可变域”是指通常位于轻链或重链的氨基-末端并且在重链中具有约120至130个氨基酸长度且在轻链中具有约100至110个氨基酸长度,并且在每个特定抗体对于其特定抗原的结合和特异性中使用的抗体的轻链或重链部分。重链可变区可以被称为“VH”。轻链可变区可以被称为“VL”。术语“可变”是指在抗体之间,可变区的某些节段在序列中广泛不同的事实。V区介导抗原结合并且定义特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,差异度不是在可变区的约110个氨基酸区间内均匀分布的。相反,V区由通过被称为“高变区”或者作为另外一种选择被称为“互补决定区”的差异度较大(例如,极大差异度)的较短区域隔开的约15-30个氨基酸的被称为框架区(FR)的较少变化(例如,相对不变)的延伸组成。重链和轻链的可变区分别包含通过三个高变区连接的4个主要采用β-折叠构型的FR(FR1、FR2、FR3和FR4),其形成了连接β-折叠结构并且在一些情况下构成β-折叠结构的一部分的环。每条链中的高变区通过FR紧邻地保持在一起,并且通过来自其它链的高变区,有助于抗体的抗原结合位点的形成(参见,例如,Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是显示出多种效应因子功能,如抗体对抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)的参与。在不同抗体之间,可变区的序列广泛不同。序列的变化集中在CDR,而可变区中不太变化的部分被称为框架区(FR)。轻链和重链的CDR主要负责抗体与抗原的相互作用。在具体的实施方式中,所述可变区是人可变区。

[0074] 当在本文中使用时,术语“高变区”、“HVR”、“HV”、“互补决定区”或“CDR”是指序列高变且形成结构限定的环的抗体可变区的区域。通常,抗体包含6个高变区;VH中的3个(H1、H2、H3)和VL中的3个(L1、L2、L3)。使用了一些高变区示意图并且其涵盖在本文中。Kabat CDR基于序列差异度并且是最常用的(参见,例如,Kabat等人,Sequences ofProteins of Immunological Interest,第5版.Public Health Service,National Institutes ofHealth,Bethesda,MD.(1991))。作为替代,Chothia表示结构环的位置(参见,例如,Chothia and Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。当使用Kabat编号惯例编号时,基于环的长度,Chothia CDR-H1环的末端在H32和H34之间变化(这是因为Kabat编号方案在H35A和H35B处放置了插入;如果既不存在35A也不存在35B,则环的末端位于32;如果只存在35A,则环的末端位于33;如果存在35A和35B两者,则环的末端位于34)。AbM高变区表示Kabat CDR和Chothia结构环之间的折中,并且由Oxford Molecular's AbM抗体建模软件使用(参见,例如,Martin,in Antibody Engineering,第2卷,第3章,Springer Verlag)。“contact”高变区基于可得的复合物晶体结构的分析。以下指明了来自这些高变区或CDR中每一个的残基。

[0075] 已开发并广泛使用了通用编号系统,ImMunoGeneTics(IMGT)InformationSystem®(Lefranc等人,Dev.Comp.Immunol.27(1):55-77(2003))。IMGT是专门用于人及其它脊椎动

物的免疫球蛋白(IG)、T细胞受体(TR)和主要组织相容性复合体(MHC)的综合信息系统。在本文中,就轻链或重链内的氨基酸序列和位置两者提及CDR。由于免疫球蛋白可变域结构内CDR的“位置”在物种间保守并且存在于被称为环的结构中,通过使用根据结构特征比对可变域序列的编号系统,容易地识别了CDR和框架残基。该信息可以用于来自一个物种的免疫球蛋白的CDR残基向通常来自人抗体的受体框架的移植和置换。已通过Honegger and Plückthun,J.Mol.Biol.309:657-670(2001)开发了其它编号系统(AHon)。编号系统,包括(例如)Kabat编号和IMGT唯一编号系统之间的对应是本领域技术人员熟知的(参见,例如,Kabat,如上;Chothia and Lesk,如上;Martin,如上;Lefranc等人,如上)并且以下还说明了这种对应。本文所示的示例性系统组合了Kabat和Chothia。

[0076]

	示例性	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
V_H CDR1	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
V_H CDR2	50-65	56-65	50-65	50-58	52a/53-55	47-58
V_H CDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	96-101	93-101
V_L CDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	26-32	30-36
V_L CDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-52	46-55
V_L CDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	91-96	89-96

[0077] 高变区可以包含如下所示的“延长的高变区”:VL中的24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)和89-97或89-96(L3)和VH中的26-35或26-35A(H1)、50-65或49-65(H2)和93-102、94-102或95-102(H3)。如本文所使用的,术语“高变区”、“HVR”、“HV”、“互补决定区”或“CDR”是可互换使用的。

[0078] 术语“载体”是指用于携带或包括核酸序列,包括(例如)以将核酸序列引入宿主细胞的物质。适合使用的载体包括(例如)表达载体、质粒、噬菌体载体、病毒载体、附加体和人造染色体,其可以包括对于向宿主细胞染色体稳定整合可操作的选择序列或标志物。另外,所述载体可以包括一个或多个可选择标志物基因和适当的表达控制序列。可以包括的可选择标志物基因(例如)提供了抗生素或毒素抗性、补充营养缺陷或者提供培养基中不存在的关键营养物。表达控制序列可以包括在本领域中熟知的组成型和诱导型启动子、转录增强子、转录终止子等。当共表达两种或更多种核酸分子(例如,抗体重链和轻链两者或者抗体VH和VL两者)时,可以将两个核酸分子插入(例如)到单一表达载体或者不同的表达载体中。对于单一载体表达,所述编码核酸可以操作性地连接至一个公共表达控制序列或者连接至不同的表达控制序列,如一个诱导型启动子和一个组成型启动子。可以使用本领域中熟知的方法确认核酸分子向宿主细胞的引入。这些方法包括(例如)核酸分析,如mRNA的RNA印迹或聚合酶链反应(PCR)扩增,或者用于基因产物表达的免疫印迹法,或者其它适合的分析方法以测试所引入的核酸序列或其相应基因产物的表达。本领域技术人员应理解以足够的量表达所述核酸分子以产生所期望的产物(例如,如本文所描述的α5β1整合素结合剂),并且还应理解可以使用本领域中熟知的方法优化表达水平以获得足够的表达。

[0079] “α5β1整合素-介导的疾病”和“α5β1整合素-介导的病症”和“α5β1整合素-介导的病况”是可互换使用的并且表示完全或部分由α5β1整合素或α5β1整合素与纤连蛋白的相互作用所引起的或者作为它们的结果的任何疾病、病症或病况和/或作为另外一种选择,其中期望抑制α5β1整合素与纤连蛋白的相互作用的体内影响的任何疾病、病症或病况。α5β1整

合素-介导的疾病、病症或病况包括癌症、血管生成-介导的疾病(例如,具有异常血管生成的疾病)和炎性疾病(例如,神经炎性疾病,包括MS和ALS)。在一些实施方式中,α5β1整合素-介导的疾病包括作为以表达或过表达α5β1整合素的肿瘤细胞为特征或者与所述肿瘤细胞有关的癌症的疾病、病症或病况。在一些实施方式中,α5β1整合素-介导的疾病包括以细胞(例如,肿瘤细胞)异常升高的血管生成活性为特征或与之有关的疾病、病症或病况。在一些实施方式中,α5β1整合素-介导的疾病是与异常血管生成具体相关的疾病、病症或病况(例如,眼病,糖尿病性视网膜病或年龄引起的黄斑变性)。在一些实施方式中,α5β1整合素-介导的疾病包括作为以炎性免疫应答为特征或与之相关的炎性疾病的疾病、病症或病况(例如,炎性自体免疫疾病如多发性硬化)。在一些实施方式中,α5β1整合素-介导的疾病包括作为以神经变性为特征或与之相关的神经炎性疾病的疾病、病症或病况(例如,MS或ALS)。

[0080] “有效量”一般是足以降低一种或多种症状的严重程度和/或频率,消除一种或多种症状和/或潜在原因,防止一种或多种症状和/或它们的潜在原因的发生,和/或改善或治疗由所述疾病、病症或病况所产生或与之有关的损害的量。在一些实施方式中,所述有效量是治疗有效量或预防有效量。

[0081] 如本文所使用的术语“治疗有效量”是指足以降低和/或改善给定疾病、病症或病况和/或与之有关的症状的严重程度和/或持续时间的试剂(例如,本文所述的抗体或本文所述的任何其它试剂)的量。试剂,包括治疗剂的治疗有效量可以是(i)给定疾病、病症或病况的进展或发展的降低或改善,(ii)给定疾病、病症或病况的复发、发展或发病的降低或改善,和/或(iii)改善或提高另一种疗法(例如,除α5β1整合素结合剂,如本文所描述的抗体的施用以外的疗法)的预防或治疗效果所必需的量。可以根据下列因素改变本发明公开所述的物质/分子/试剂(例如,α5β1整合素抗体)的“治疗有效量”,所述因素如个体的疾病状况、年龄、性别和体重以及物质/分子/试剂在所述个体中引起所期望的反应的能力。治疗有效量涵盖了其中所述物质/分子/试剂的治疗有益效果大于任何毒性或不利影响的量。在一些实施方式中,术语“治疗有效量”是指对于“治疗”受试者或哺乳动物中疾病、病症或病况有效的抗体或其它试剂(例如,或者药物)的量。

[0082] “预防有效量”是当向受试者施用时,将具有预期预防作用,例如,预防或延迟疾病、病症或病况的发病(或复发),或者降低疾病、病症或病况或相关症状的发病(或复发)的可能性的药物组合物的量。完全治疗或预防作用不必需通过一个剂量的施用发生,并且可以仅在一系列剂量施用后发生。因此,可以在一个或多个施用中施用治疗或预防有效量。

[0083] 如本文所使用的术语“药物可用的”表示联邦或州政府管理机构批准的或者美国药典、欧洲药典或其它通常承认的药典中所列的用于在动物,并且更具体地在人中使用的。

[0084] 如本文所使用的“载体”包括在所使用的剂量和浓度下对向其暴露的细胞或哺乳动物无毒的载体、赋形剂或稳定剂。通常,载体是水性pH缓冲溶液。载体的实例包括缓冲液,如磷酸盐、柠檬酸盐及其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(例如,小于约10个氨基酸残基)多肽;蛋白,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天门冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖及其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖醇,如甘露糖醇或山梨糖醇;盐形成反离子,如钠;和/或非离子型表面活性剂,如TWEEN™、聚乙二醇(PEG)和PLURONICS™。术语“载体”还可以表示与其施用治疗剂的稀释剂、佐剂(例如,弗氏佐剂(完全和不完全))、赋形剂

或媒介物。这些载体可以是无菌液体,如水和油剂,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,如花生油、豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用组合物(例如,药物组合物)时,水是示例性载体。盐溶液以及葡萄糖和甘油水溶液也可以用作液体载体,具体地用于可注射溶液。适合的赋形剂(例如,药物赋形剂)包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、水稻、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要,所述组合物还可以含有少量润湿剂或乳化剂,或者pH缓冲剂。组合物可以采取溶液、混悬液、乳液、片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、缓释制剂等的形式。口服组合物,包括制剂可以包括标准载体,如药品级甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。适合的载体的实例描述于Remington's Pharmaceutical Sciences(1990)MackPublishing Co.,Easton,PA。组合物,包括药物化合物,可以与适当的量的载体一起含有预防或治疗有效量的α5β1整合素结合剂(例如,抗体),例如,处于分离或纯化形式的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)以提供用于向受试者(例如,患者)适当施用的形式。制剂应适合施用形式。

[0085] 在一些实施方式中,本发明公开提供了可以在本文中作为治疗剂使用的α5β1整合素结合剂。这些试剂包括结合至α5β1整合素的抗体(例如,单特异性或多重特异性,包括双重特异性)。示例性抗体包括多克隆、单克隆、人源化、人、双重特异性和异源缀合物抗体,及其具有升高或降低的亲和力或其它性质的变体。

[0086] 在一些实施方式中,本文描述了结合至α5β1整合素,包括α5β1整合素多肽、α5β1整合素多肽片段、α5β1整合素肽或α5β1整合素表位的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)。在一些实施方式中,α5β1整合素结合剂是结合α5β1整合素,包括α5整合素多肽、α5整合素多肽片段、α5整合素肽或α5整合素表位的人、人源化或嵌合抗体(例如,包含人恒定区)。在一些实施方式中,α5β1整合素结合剂(例如,抗体),如人α5β1整合素结合剂可以结合至在哺乳动物(例如,人)细胞,包括α5β1整合素表达肿瘤细胞表面上表达的α5β1整合素。在一些实施方式中,α5β1整合素结合剂(例如,抗体)结合在细胞,如肿瘤细胞上暴露的α5β1整合素胞外表位(例如,α5β1整合素表位)。在一些实施方式中,本文描述了结合至α5β1整合素,如人α5β1整合素或其部分的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)。在一些实施方式中,α5β1整合素为人α5β1整合素。在一些实施方式中,α5β1整合素结合剂为人α5β1整合素结合剂(例如,结合至人α5β1整合素的抗体)。本文描述了人α5整合素和人β1整合素的示例性氨基酸序列。

[0087] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)与包含本文所述的抗体中任一种的VH区、VL区、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3,如表1-6中所示的VH区、VL区、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3的氨基酸序列的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)竞争性地与α5β1整合素,如人α5β1整合素结合。因此,在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)与包含来自下列的1、2和/或3个VH CDR和/或1、2和/或3个VL CDR的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)竞争性地与α5β1整合素,如人α5β1整合素结合:(a)表示为A-15B08的抗体;(b)表示为A2-3B06的抗体;(c)表示为A2-5D10的抗体;(d)表示为A2-7A05的抗体;(e)表示为A2-7F01的抗体;或者(f)表示为C-14D12的抗体,如表1-6所示。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)与包含来自下列的1、2和/或3个VH CDR和1、2和/或3个VL CDR的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)竞争性地与α5β1整合素,如人α5β1整合素结合:a)表示为A-15B08的抗体;(b)表示为A2-3B06的抗体;(c)表示为A2-5D10的抗体;(d)表示为A2-7A05

的抗体;(e)表示为A2-7F01的抗体;或者(f)表示为C-14D12的抗体,如表1-6所示。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)与包含来自下列的VH区和VL区的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)竞争性地与α5β1整合素,如人α5β1整合素结合:a)表示为A-15B08的抗体;(b)表示为A2-3B06的抗体;(c)表示为A2-5D10的抗体;(d)表示为A2-7A05的抗体;(e)表示为A2-7F01的抗体,或者(f)表示为C-14D12的抗体,如表1-6所示。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)与包含下列的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)竞争性地与α5β1整合素,如人α5β1整合素结合:(a)包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的VH区,或其人源化变体,包含SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的VL区,或其人源化变体;(b)包含SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列的VH区,或其人源化变体,包含SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的VL区,或其人源化变体;(c)包含SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列的VH区,或其人源化变体,包含SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列的VL区,或其人源化变体;(d)包含SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列的VH区,或其人源化变体,包含SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列的VL区,或其人源化变体;(e)包含SEQ ID NO:91所示的氨基酸序列的VH区,或其人源化变体,包含SEQ ID NO:92所示的氨基酸序列的VL区,或其人源化变体,或(f)包含SEQ ID NO:109所示的氨基酸序列的VH区,或其人源化变体,包含SEQ ID NO:110所示的氨基酸序列的VL区,或其人源化变体。

[0088] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)包含本文所述的抗体中任一种的VH区、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VLCDR2和/或VL CDR3,如表1-6中所示的VH区、VL区、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3的氨基酸序列。因此,在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)包含来自下列的1、2和/或3个重链CDR和/或1、2和/或3个轻链CDR:(a)表示为A-15B08的抗体;(b)表示为A2-3B06的抗体;(c)表示为A2-5D10的抗体;(d)表示为A2-7A05的抗体;(e)表示为A2-7F01的抗体;或者(f)表示为C-14D12的抗体,如表1-6所示。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)包含来自下列的1、2和3个重链CDR和1、2和3个轻链CDR:(a)表示为A-15B08的抗体;(b)表示为A2-3B06的抗体;(c)表示为A2-5D10的抗体;(d)表示为A2-7A05的抗体;(e)表示为A2-7F01的抗体;或者(f)表示为C-14D12的抗体,如表1-6所示。

[0089] 在一些实施方式中,α5β1整合素结合剂(例如,抗体)包含本文所描述的结合剂中任一种的VH区,其包含VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3,和VL区,其包含VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3(参见,例如,表1、表2、表3、表4、表5、表6)。因此,在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)包含来自表1的1、2和/或3个重链CDR(例如,VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3)和/或1、2和/或3个轻链CDR(例如,VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3)。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂包含来自表2的1、2和/或3个重链CDR(例如,VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3)和/或1、2和/或3个轻链CDR(例如,VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3)。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)包含来自表3的1、2和/或3个重链CDR(例如,VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3)和/或1、2和/或3个轻链CDR(例如,VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3)。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂包含来自表4的1、2和/或3个重链CDR(例如,VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3)和/或1、2和/或3个轻链CDR(例如,VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3)。在一些实施方式

中,本文所描述的α5β1整合素结合剂包含来自表5的1、2和/或3个重链CDR(例如,VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3)和/或1、2和/或3个轻链CDR(例如,VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3)。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂包含来自表6的1、2和/或3个重链CDR(例如,VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3)和/或1、2和/或3个轻链CDR(例如,VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3)。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)是多重特异性的(例如,双重特异性的)并且包含第一结合域,所述第一结合域包含来自表1、表2、表3、表4、表5或表6的1、2和/或3个重链CDR(例如,VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3)和/或1、2和/或3个轻链CDR(例如,VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3),和第二结合域,所述第二结合域包含来自结合至非α5β1整合素的第二靶标抗原(例如,αvβ3整合素、α4β1整合素、α4β7整合素、TREM2、TNFα、IL-6、IL-1β、CSF1、CSF-1R、C1Q、CD40L、FGFR、IL-12和I型干扰素)的结合剂的1、2和/或3个重链CDR(例如,VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3)和/或1、2和/或3个轻链CDR(例如,VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3)。

[0090] 表示为A-15B08的抗体包含如表1所示的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或者IMGT的CDR序列,并且在一些实施方式中,可以包含SEQ ID NO:25所示的VH序列或其人源化变体和SEQ ID NO:26所示的VL序列或其人源化变体。

[0091] 表示为A2-3B06的抗体包含如表2所示的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或者IMGT的CDR序列,并且在一些实施方式中,可以包含SEQ ID NO:42所示的VH序列或其人源化变体和SEQ ID NO:43所示的VL序列或其人源化变体。

[0092] 表示为A2-5D10的抗体包含如表3所示的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或者IMGT的CDR序列,并且在一些实施方式中,可以包含SEQ ID NO:51所示的VH序列或其人源化变体和SEQ ID NO:52所示的VL序列或其人源化变体。

[0093] 表示为A2-7A05的抗体包含如表4所示的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或者IMGT的CDR序列,并且在一些实施方式中,可以包含SEQ ID NO:77所示的VH序列或其人源化变体和SEQ ID NO:78所示的VL序列或其人源化变体。

[0094] 表示为A2-7F01的抗体包含如表5所示的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或者IMGT的CDR序列,并且在一些实施方式中,可以包含SEQ ID NO:91所示的VH序列或其人源化变体和SEQ ID NO:92所示的VL序列或其人源化变体。

[0095] 表示为C-14D12的抗体包含如表6所示的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或者IMGT的CDR序列,并且在一些实施方式中,可以包含SEQ ID NO:109所示的VH序列或其人源化变体和SEQ ID NO:110所示的VL序列或其人源化变体。

[0096]

表 1：抗体 A-15B08

		示例性	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
VH CDR Seq.	VH CDR1	GFSLTSYGVH (SEQ ID NO：1)	GFSLTSYG (SEQ ID NO：7)	SYGVH (SEQ ID NO：12)	GFSLTSY (SEQ ID NO：13)	TSYGVH (SEQ ID NO：18)	GFSLTSYGVH (SEQ ID NO：1)
	VH CDR2	VIWSDGSTTYNST LKS (SEQ ID NO：2)	IWSDGST (SEQ ID NO：8)	VIWSDGSTTYNST LKS (SEQ ID NO：2)	SDG (SEQ ID NO：14)	WLVVIWSDGSTT (SEQ ID NO：19)	VIWSDGSTT (SEQ ID NO：24)
	VH CDR3	HYDYDGDWFAY (SEQ ID NO：3)	ARHYDYDGDWF AY (SEQ ID NO：9)	HYDYDGDWFAY (SEQ ID NO：3)	YDYDGDWFA (SEQ ID NO：15)	ARHYDYDGDWF A (SEQ ID NO：20)	HYDYDGDWFAY (SEQ ID NO：3)
VL CDR Seq.	VL CDR1	TASSRVSSNSLH (SEQ ID NO：4)	SRVSSNS (SEQ ID NO：10)	TASSRVSSNSLH (SEQ ID NO：4)	SSRVSSNS (SEQ ID NO：16)	SSNSLHWY (SEQ ID NO：21)	TASSRVSSNSLH (SEQ ID NO：4)
	VL CDR2	STSNLAS (SEQ ID NO：5)	STS (SEQ ID NO：11)	STSNLAS (SEQ ID NO：5)	STS (SEQ ID NO：11)	LWIYSTSNLA (SEQ ID NO：22)	STSNLAS (SEQ ID NO：5)
	VL CDR3	HQYLRSPPT (SEQ ID NO：6)	HQYLRSPPT (SEQ ID NO：6)	HQYLRSPPT (SEQ ID NO：6)	YLRSPP (SEQ ID NO：17)	HQYLRSPP (SEQ ID NO：23)	HQYLRSPPT (SEQ ID NO：6)

VH 序列
QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTISGFSLTSYGVHWVRQPPGKGLEWLVVIWSDGSTTYNSTLKSRLSISKDNSKSQVFFKMNSLQTDDTAMYYCARHY
DYDGDWFAYWGQGTLVTVSA（SEQ ID NO：25）

VL 序列
QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSRVSSNSLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYLRSPPTFGG
GTKLEIK（SEQ ID NO：26）

作为另外一种选择，VH CDR2 中的 NST 是 NSA 或 X_1SX_2，其中 X_1 为 N、Q、S 或 A 和/或 X_2 为 A 或 T。

[0097]

表 2：抗体 A2-3B06

		示例性	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
VH CDR Seq.	VH CDR1	GFSLTTYGVH (SEQ ID NO：27)	GFSLTTYG (SEQ ID NO：31)	TYGVH (SEQ ID NO：34)	GFSLTTY (SEQ ID NO：35)	TTYGVH (SEQ ID NO：38)	GFSLTTYGVH (SEQ ID NO：27)
	VH CDR2	VIWSDGSTTYNSALKS (SEQ ID NO：28)	IWSDGST (SEQ ID NO：8)	VIWSDGSTTYNSALKS (SEQ ID NO：28)	SDG (SEQ ID NO：14)	WLVVIWSDGSTT (SEQ ID NO：19)	VIWSDGSTT (SEQ ID NO：24)
	VH CDR3	HGGLLRRDAMDY (SEQ ID NO：29)	VRHGGLLRRDAMDY (SEQ ID NO：32)	HGGLLRRDAMDY (SEQ ID NO：29)	GGLLRRDAMD (SEQ ID NO：36)	VRHGGLLRRDAMD (SEQ ID NO：39)	HGGLLRRDAMDY (SEQ ID NO：29)
VL CDR Seq.	VL CDR1	TASSSVSSNSFH (SEQ ID NO：30)	SSVSSNS (SEQ ID NO：33)	TASSSVSSNSFH (SEQ ID NO：30)	SSSVSSNS (SEQ ID NO：37)	SSNSFHWY (SEQ ID NO：40)	TASSSVSSNSFH (SEQ ID NO：30)
	VL CDR2	STSNLAS (SEQ ID NO：5)	STS (SEQ ID NO：11)	STSNLAS (SEQ ID NO：5)	STS (SEQ ID NO：11)	LWLYSTSNLA (SEQ ID NO：41)	STSNLAS (SEQ ID NO：5)
	VL CDR3	HQYLRSPPT (SEQ ID NO：6)	HQYLRSPPT (SEQ ID NO：6)	HQYLRSPPT (SEQ ID NO：6)	YLRSPP (SEQ ID NO：17)	HQYLRSPP (SEQ ID NO：23)	HQYLRSPPT (SEQ ID NO：6)
VH 序列 QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTISGFSLTTYGVHWVRQPPGKGLEWLVVIWSDGSTTYNSALKSRLNITKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCVRH GGLLRRDAMDYWGQGTSVTVSS（SEQ ID NO：42）							
VL 序列 QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSNSFHWYQQKPGSSPKLWLYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYLRSPPTFG GGTKLEIK（SEQ ID NO：43）							

[0098]

表 3：抗体 A2-5D10

		示例性	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
VH CDR Seq.	VH CDR1	GFSLTSYGVH (SEQ ID NO：1)	GFSLTSYG (SEQ ID NO：7)	SYGVH (SEQ ID NO：12)	GFSLTSY (SEQ ID NO：13)	TSYGVH (SEQ ID NO：18)	GFSLTSYGVH (SEQ ID NO：1)
	VH CDR2	VIWSDGSTTYNST LKS (SEQ ID NO：2)	IWSDGST (SEQ ID NO：8)	VIWSDGSTTYNST LKS (SEQ ID NO：2)	SDG (SEQ ID NO：14)	WLVVIWSDGSTT (SEQ ID NO：19)	VIWSDGSTT (SEQ ID NO：24)
	VH CDR3	HYDYDGDWFAY (SEQ ID NO：3)	ARHYDYDGDWF AY (SEQ ID NO：9)	HYDYDGDWFAY (SEQ ID NO：3)	YDYDGDWFA (SEQ ID NO：15)	ARHYDYDGDWF A (SEQ ID NO：20)	HYDYDGDWFAY (SEQ ID NO：3)
VL CDR Seq.	VL CDR1	TASSSVSSRCLH (SEQ ID NO：44)	SSVSSRC (SEQ ID NO：46)	TASSSVSSRCLH (SEQ ID NO：44)	SSSVSSRC (SEQ ID NO：47)	SSRCLHWY (SEQ ID NO：49)	TASSSVSSRCLH (SEQ ID NO：44)
	VL CDR2	STSNLAS (SEQ ID NO：5)	STS (SEQ ID NO：11)	STSNLAS (SEQ ID NO：5)	STS (SEQ ID NO：11)	LWIYSTSNLA (SEQ ID NO：22)	STSNLAS (SEQ ID NO：5)
	VL CDR3	HQYYRSPPT (SEQ ID NO：45)	HQYYRSPPT (SEQ ID NO：45)	HQYYRSPPT (SEQ ID NO：45)	YYRSPP (SEQ ID NO：48)	HQYYRSPP (SEQ ID NO：50)	HQYYRSPPT (SEQ ID NO：45)
VH 序列 QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTISGFSLTSYGVHWVRQPPGKGLEWLVVIWSDGSTTYNSTLKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARHY DYDGDWFAYWGQGTLVTVSA（SEQ ID NO：51）						
VL 序列 QILLTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSRCLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFRGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYYRSPPTFG GGTKLEIK（SEQ ID NO：52）						

作为另外一种选择，VH CDR2 中的 NST 是 NSA 或 X_1SX_2，其中 X_1 为 N、Q、S 或 A 和/或 X_2 为 A 或 T。作为另外一种选择，VL CDR1 中的 C 是 S、A 或 V。

[0099]

表 4：抗体 A2-7A05

		示例性	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
VH CDR Seq.	VH CDR1	GYTFTIYWIN (SEQ ID NO：53)	GYTFTIYW (SEQ ID NO：59)	IYWIN (SEQ ID NO：64)	GYTFTIY (SEQ ID NO：65)	TIYWIN (SEQ ID NO：70)	GYTFTIYWIN (SEQ ID NO：53)
	VH CDR2	KIYPGSISTDYNEKFKS (SEQ ID NO：54)	IYPGSIST (SEQ ID NO：60)	KIYPGSISTDYNEKFKS (SEQ ID NO：54)	PGSI (SEQ ID NO：66)	WIGKIYPGSISTD (SEQ ID NO：71)	KIYPGSISTD (SEQ ID NO：76)
	VH CDR3	TGTGGLAY (SEQ ID NO：55)	AITGTGGLAY (SEQ ID NO：61)	TGTGGLAY (SEQ ID NO：55)	GTGGLA (SEQ ID NO：67)	AITGTGGLA (SEQ ID NO：72)	TGTGGLAY (SEQ ID NO：55)
VL CDR Seq.	VL CDR1	RASSSVNYMY (SEQ ID NO：56)	SSVNY (SEQ ID NO：62)	RASSSVNYMY (SEQ ID NO：56)	SSSVNY (SEQ ID NO：68)	NYMYWY (SEQ ID NO：73)	RASSSVNYMY (SEQ ID NO：56)
	VL CDR2	FTSSLAP (SEQ ID NO：57)	FTS (SEQ ID NO：63)	FTSSLAP (SEQ ID NO：57)	FTS (SEQ ID NO：63)	LWIYFTSSLA (SEQ ID NO：74)	FTSSLAP (SEQ ID NO：57)
	VL CDR3	QQFTTSPFT (SEQ ID NO：58)	QQFTTSPFT (SEQ ID NO：58)	QQFTTSPFT (SEQ ID NO：58)	FTTSPF (SEQ ID NO：69)	QQFTTSPF (SEQ ID NO：75)	QQFTTSPFT (SEQ ID NO：58)
VH 序列： QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTIYWINWVKQRPGQGLEWIGKIYPGSISTDYNEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYYCAIT GTGGLAYWGQGTLVTVSA（SEQ ID NO：77）							
VL 序列： ENVLTQSPAIMSASLGEKVTMTCRASSSVNYMYWYQQKSDASPKLWIYFTSSLAPGVPGRFSGSGSGNSYSLTISTMEGEDAATYYCQQFTTSPFTFGS GTKLEIK（SEQ ID NO：78）							

[0100]

表 5：抗体 A2-7F01

		示例性	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
VH CDR Seq.	VH CDR1	GYTFTIYWIN (SEQ ID NO：53)	GYTFTIYW (SEQ ID NO：59)	IYWIN (SEQ ID NO：64)	GYTFTIY (SEQ ID NO：65)	TIYWIN (SEQ ID NO：70)	GYTFTIYWIN (SEQ ID NO：53)
	VH CDR2	NIYPGSSSTNYNE KFKT (SEQ ID NO：79)	IYPGSSST (SEQ ID NO：82)	NIYPGSSSTNYNE KFKT (SEQ ID NO：79)	PGSS (SEQ ID NO：84)	WIGNIYPGSSSTN (SEQ ID NO：87)	NIYPGSSSTN (SEQ ID NO：90)
	VH CDR3	TGTGGFAY (SEQ ID NO：80)	AITGTGGFAY (SEQ ID NO：83)	TGTGGFAY (SEQ ID NO：80)	GTGGFA (SEQ ID NO：85)	AITGTGGFA (SEQ ID NO：88)	TGTGGFAY (SEQ ID NO：80)
VL CDR Seq.	VL CDR1	RASSSVNYMY (SEQ ID NO：56)	SSVNY (SEQ ID NO：62)	RASSSVNYMY (SEQ ID NO：56)	SSSVNY (SEQ ID NO：68)	NYMYWY (SEQ ID NO：73)	RASSSVNYMY (SEQ ID NO：56)
	VL CDR2	FTSSLAP (SEQ ID NO：57)	FTS (SEQ ID NO：63)	FTSSLAP (SEQ ID NO：57)	FTS (SEQ ID NO：63)	LWIYFTSSLA (SEQ ID NO：74)	FTSSLAP (SEQ ID NO：57)
	VL CDR3	QQLTGSPFT (SEQ ID NO：81)	QQLTGSPFT (SEQ ID NO：81)	QQLTGSPFT (SEQ ID NO：81)	LTGSPF (SEQ ID NO：86)	QQLTGSPF (SEQ ID NO：89)	QQLTGSPFT (SEQ ID NO：81)
VH 序列： QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTIYWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPGSSSTNYNEKFKTKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYYCAIT GTGGFAYWGQGTLVTVSA（SEQ ID NO：91）					
VL 序列： ENVLTQSPAIMSASLGEKVTMSCRASSSVNYMYWYQQKSDASPKLWIYFTSSLAPGVPTRFSGSGSGNSFSLTISSMEGEDAATYYCQQLTGSPFTFGSG TRLEIK（SEQ ID NO：92）					

[0101]

表 6：抗体 C-14D12

		示例性	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
VH CDR Seq.	VH CDR1	GFSLTDYGVH (SEQ ID NO：93)	GFSLTDYG (SEQ ID NO：97)	DYGVH (SEQ ID NO：100)	GFSLTDY (SEQ ID NO：101)	TDYGVH (SEQ ID NO：105)	GFSLTDYGVH (SEQ ID NO：93)
	VH CDR2	VIWSDGSTTYNSALKS (SEQ ID NO：28)	IWSDGST (SEQ ID NO：8)	VIWSDGSTTYNSALKS (SEQ ID NO：28)	SDG (SEQ ID NO：14)	WLVVIWSDGSTT (SEQ ID NO：19)	VIWSDGSTT (SEQ ID NO：24)
	VH CDR3	HAPSFIRYGSRYDALDY (SEQ ID NO：94)	ARHAPSFIRYGSRYDALDY (SEQ ID NO：98)	HAPSFIRYGSRYDALDY (SEQ ID NO：94)	APSFIRYGSRYDALD (SEQ ID NO：102)	ARHAPSFIRYGSRYDALDY (SEQ ID NO：106)	HAPSFIRYGSRYDALDY (SEQ ID NO：94)
VL CDR Seq.	VL CDR1	TASSSVTSSFLH (SEQ ID NO：95)	SSVTSSF (SEQ ID NO：99)	TASSSVTSSFLH (SEQ ID NO：95)	SSSVTSSF (SEQ ID NO：103)	TSSFLHWY (SEQ ID NO：107)	TASSSVTSSFLH (SEQ ID NO：95)
	VL CDR2	STSNLAS (SEQ ID NO：5)	STS (SEQ ID NO：11)	STSNLAS (SEQ ID NO：5)	STS (SEQ ID NO：11)	LWIYSTSNLA (SEQ ID NO：22)	STSNLAS (SEQ ID NO：5)
	VL CDR3	HQYHRSPPT (SEQ ID NO：96)	HQYHRSPPT (SEQ ID NO：96)	HQYHRSPPT (SEQ ID NO：96)	YHRSPP (SEQ ID NO：104)	HQYHRSPP (SEQ ID NO：108)	HQYHRSPPT (SEQ ID NO：96)
VH 序列 QVQLKESGPDLVAPSQSLSITCTVSGFSLTDYGVHWVRQPPGKGLEWLVVIWSDGSTTYNSALKSRLSITKDTSKRQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARH APSFIRYGSRYDALDYWGQGTSVTVSS（SEQ ID NO：109）							
VL 序列 QIVLTQSPAIMSASLGERVTLTCTASSSVTSSFLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSPPTFGG GTKLEIK（SEQ ID NO：110）							

[0102] 在一些实施方式中，本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如，抗体，如双重特异性抗体)，包括人α5β1整合素结合剂，包含VH区或VH域。在其它实施方式中，本文所描述的α5β1

整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂,包含VL区或VL域。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂,具有下列组合:(i)VH域或VH区;和/或(ii)VL域或VL区。

[0103] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含具有以下组合的重链:(i)包含表1-6的任一项中所描述的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的CDR的VH域;和(ii)一个或多个重链恒定结构域(例如,CH1、铰链、CH2和CH3)。示例性IgG重链包含如本文所描述的任何VH域和随后的CH1、铰链、CH2和CH3氨基酸序列:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 117)。

另一个示例性IgG重链包含具有如本文所描述的CDR的任何VH域和随后的CH1、铰链、CH2和CH3氨基酸序列:

[0104] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 118)。

图3中显示了示例性Fc序列。

[0105] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含具有下列组合的轻链:(i)包含表1-6的任一项中所描述的CDR的VL域;和(ii)轻链恒定结构域(CL)。示例性轻链(例如,用于与IgG重链配对的轻链)包含具有如本文所描述的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的CDR的任何VL域和随后的CL氨基酸序列:

[0106] RTVAAPSVFIFPPSDSQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 119)。

[0107] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂,包含(a)具有下列组合的重链:(i)具有表1-6的任一项中所描述的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的CDR的VH域和(ii)一个或多个重链恒定结构域(例如,CH1、铰链、CH2和CH3);和(a)具有下列组合的轻链:(i)具有表1-6的任一项中所描述的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的CDR的VL域和(ii)轻链恒定结构域(CL)。

[0108] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括6种CDR,例如,表1中所鉴别的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。在一些实施方式中,本文所描述

的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括6种CDR,例如,表2中所鉴别的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括6种CDR,例如,表3中所鉴别的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括6种CDR,例如,表4中所鉴别的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括6种CDR,例如,表5中所鉴别的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括6种CDR,例如,表6中所鉴别的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括6种CDR,例如,表1、2、3、4、5和/或6中所鉴别的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。

[0109] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括3种VH CDR,例如,表1中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3。在其它实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括3种CDR,例如,表1中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。在又一其它实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括3种VH CDR,例如,表1中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3,和一个或多个CDR,包括3种VL CDR,例如,表1中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。

[0110] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括3种VH CDR,例如,表2中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3。在其它实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括3种CDR,例如,表2中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。在又一其它实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括3种VH CDR,例如,表2中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3,和一个或多个CDR,包括3种VL CDR,例如,表2中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。

[0111] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性

抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括3种VH CDR,例如,表3中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3。在其它实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括3种CDR,例如,表3中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。在又一其它实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括3种VH CDR,例如,表3中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3,和一个或多个CDR,包括3种VL CDR,例如,表3中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。

[0112] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括3种VH CDR,例如,表4中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3。在其它实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括3种CDR,例如,表4中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。在又一其它实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括3种VH CDR,例如,表4中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3,和一个或多个CDR,包括3种VL CDR,例如,表4中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。

[0113] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括3种VH CDR,例如,表5中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3。在其它实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括3种CDR,例如,表5中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。在又一其它实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括3种VH CDR,例如,表5中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3,和一个或多个CDR,包括3种VL CDR,例如,表5中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。

[0114] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括3种VH CDR,例如,表6中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3。在其它实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含一个或多个CDR,包括3种CDR,例如,表6中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。在又一其它实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体),包括人α5β1整合素结合

剂包含一个或多个CDR,包括3种VH CDR,例如,表6中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3,和一个或多个CDR,包括3种VL CDR,例如,表6中所列的根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。

[0115] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含一个或多个互补决定区(CDR),所述互补决定区包含选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:1-24、27-41、44-50、53-76、79-90和93-108。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含两个或多个互补决定区(CDR),所述互补决定区包含选自下列的氨基酸序列SEQ ID NO:1-24、27-41、44-50、53-76、79-90和93-108。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含三个或多个互补决定区(CDR),所述互补决定区包含选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:1-24、27-41、44-50、53-76、79-90和93-108。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含四个或多个互补决定区(CDR),所述互补决定区包含选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:1-24、27-41、44-50、53-76、79-90和93-108。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含五个或多个互补决定区(CDR),所述互补决定区包含选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:1-24、27-41、44-50、53-76、79-90和93-108。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含六个或多个互补决定区(CDR),所述互补决定区包含选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:1-24、27-41、44-50、53-76、79-90和93-108。

[0116] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含表1-6中所列的一个或多个(例如,1、2或3个)VH CDR。在其它实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含表1-6中所列的一个或多个(例如,1、2或3个)VL CDR。在又一其它实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含表1-6中所列的一个或多个(例如,1、2或3个)VH CDR和表1-6中所列的一个或多个VL CDR。因此,在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含具有SEQ ID NO:1、7、12、13、18、27、31、34、35、38、53、59、64、65、70、93、97、100、101和105中任一项所示的氨基酸序列的VH CDR1。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含具有SEQ ID NO:2、8、14、19、24、28、54、60、66、71、76、79、82、84、87和90中任一项所示的氨基酸序列的VH CDR2。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含具有SEQ ID NO:3、9、15、20、29、32、36、39、55、61、67、72、80、83、85、88、94、98、102和106中任一项所示的氨基酸序列的VH CDR3。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含VH CDR1和/或VH CDR2和/或VH CDR3独立地选自如表1-6中所示的氨基酸序列中任一项中所示的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含具有SEQ ID NO:4、10、16、21、30、33、37、40、44、46、47、49、56、62、68、73、95、99、103和107中任一项所示的氨基酸序列的VL CDR1。在另一个实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含具有SEQ ID NO:5、11、22、41、57、63和74中任一项所示的氨基酸序列的VL CDR2。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如

双重特异性抗体)包含具有SEQ ID NO:6、17、23、45、48、50、58、69、75、81、86、89、96、104和108中任一项所示的氨基酸序列的VL CDR3。在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含VL CDR1和/或VL CDR2和/或VL CDR3独立地选自如表1-6中所示的氨基酸序列中任一项中所示的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3。

[0117] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有选自下列的氨基酸序列的VH CDR1:(i)SEQ ID NO:1、27、53或93,(ii)SEQ ID NO:7、31、59或97,(iii)SEQ ID NO:12、34、64或100,(iv)SEQ ID NO:13、35、65或101和(v)SEQ ID NO:18、38、70或105;(2)具有选自下列的氨基酸序列的VH CDR2:(i)SEQ ID NO:2、28、54或79,(ii)SEQ ID NO:8、60或82,(iii)SEQ ID NO:14、66或84(iv)SEQ ID NO:19、71或87和(v)SEQ ID NO:24、76;或90和(3)具有选自下列的氨基酸序列的VH CDR3:(i)SEQ ID NO:3、29、55、80或94,(ii)SEQ ID NO:9、32、61、83或98,(iii)SEQ ID NO:15、36、67、85或102和(iv)SEQ ID NO:20、39、72、88或106;和/或轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有选自下列的氨基酸序列的VL CDR1:(i)SEQ ID NO:4、30、44、56或95,(ii)SEQ ID NO:10、33、46、62或99,(iii)SEQ ID NO:16、37、47、68或103和(iv)SEQ ID NO:21、40、49、73或107;(2)具有选自下列的氨基酸序列的VL CDR2:(i)SEQ ID NO:5或57,(ii)SEQ ID NO:11或63和(iii)SEQ ID NO:22、41或74;和(3)具有选自下列的氨基酸序列的VL CDR3:(i)SEQ ID NO:6、45、58、81或96,(ii)SEQ ID NO:17、48、69、86或104和(iii)SEQ ID NO:23、50、75、89或108。

[0118] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有选自下列的氨基酸序列的VH CDR1:(i)SEQ ID NO:1、27、53或93,(ii)SEQ ID NO:7、31、59或97,(iii)SEQ ID NO:12、34、64或100,(iv)SEQ ID NO:13、35、65或101和(v)SEQ ID NO:18、38、70或105;(2)具有选自下列的氨基酸序列的VH CDR2:(i)SEQ ID NO:2、28、54或79,(ii)SEQ ID NO:8、60或82,(iii)SEQ ID NO:14、66或84(iv)SEQ ID NO:19、71或87和(v)SEQ ID NO:24、76;或90和(3)具有选自下列的氨基酸序列的VH CDR3:(i)SEQ ID NO:3、29、55、80或94,(ii)SEQ ID NO:9、32、61、83或98,(iii)SEQ ID NO:15、36、67、85或102和(iv)SEQ ID NO:20、39、72、88或106。

[0119] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有选自下列的氨基酸序列的VL CDR1:(i)SEQ ID NO:4、30、44、56或95,(ii)SEQ ID NO:10、33、46、62或99,(iii)SEQ ID NO:16、37、47、68或103和(iv)SEQ ID NO:21、40、49、73或107;(2)具有选自下列的氨基酸序列的VL CDR2:(i)SEQ ID NO:5或57,(ii)SEQ ID NO:11或63和(iii)SEQ ID NO:22、41或74;和(3)具有选自下列的氨基酸序列的VL CDR3:(i)SEQ ID NO:6、45、58、81或96,(ii)SEQ ID NO:17、48、69、86或104和(iii)SEQ ID NO:23、50、75、89或108。

[0120] 在一些实施方式中,本文描述了结合至α5β1整合素的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有选自下列的氨基酸序列的VH CDR1:(i)SEQ ID NO:1、27、53或93,(ii)SEQ ID NO:7、31、59或97,(iii)SEQ ID NO:12、34、64或100,(iv)SEQ ID NO:13、35、65或101和(v)SEQ ID NO:18、38、70或105;(2)具有选自下列的氨基酸序列的VH CDR2:(i)SEQ ID NO:2、28、54或79,(ii)SEQ ID NO:

8、60或82,(iii)SEQ ID NO:14、66或84(iv)SEQ ID NO:19、71或87和(v)SEQ ID NO:24、76;或90和(3)具有选自下列的氨基酸序列的VH CDR3:(i)SEQ ID NO:3、29、55、80或94,(ii)SEQ ID NO:9、32、61、83或98,(iii)SEQ ID NO:15、36、67、85或102和(iv)SEQ ID NO:20、39、72、88或106;和/或轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有选自下列的氨基酸序列的VL CDR1:(i)SEQ ID NO:4、30、44、56或95,(ii)SEQ ID NO:10、33、46、62或99,(iii)SEQ ID NO:16、37、47、68或103和(iv)SEQ ID NO:21、40、49、73或107;(2)具有选自下列的氨基酸序列的VL CDR2:(i)SEQ ID NO:5或57,(ii)SEQ ID NO:11或63和(iii)SEQ ID NO:22、41或74;和(3)具有选自下列的氨基酸序列的VLCDR3:(i)SEQ ID NO:6、45、58、81或96,(ii)SEQ ID NO:17、48、69、86或104和(iii)SEQ ID NO:23、50、75、89或108。

[0121] 在一些实施方式中,本文描述了结合至α5β1整合素的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有选自下列的氨基酸序列的VH CDR1:(i)SEQ ID NO:1、27、53或93,(ii)SEQ ID NO:7、31、59或97,(iii)SEQ ID NO:12、34、64或100,(iv)SEQ ID NO:13、35、65或101和(v)SEQ ID NO:18、38、70或105;(2)具有选自下列的氨基酸序列的VH CDR2:(i)SEQ ID NO:2、28、54或79,(ii)SEQ ID NO:8、60或82,

[0122] (iii)SEQ ID NO:14、66或84(iv)SEQ ID NO:19、71或87和(v)SEQ ID NO:24、76;或90和(3)具有选自下列的氨基酸序列的VH CDR3:(i)SEQ ID NO:3、29、55、80或94,(ii)SEQ ID NO:9、32、61、83或98,(iii)SEQ ID NO:15、36、67、85或102和(iv)SEQ ID NO:20、39、72、88或106。

[0123] 在一些实施方式中,本文描述了结合至α5β1整合素的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有选自下列的氨基酸序列的VL CDR1:(i)SEQ ID NO:4、30、44、56或95,(ii)SEQ ID NO:10、33、46、62或99,(iii)SEQ ID NO:16、37、47、68或103和(iv)SEQ ID NO:21、40、49、73或107;(2)具有选自下列的氨基酸序列的VL CDR2:(i)SEQ ID NO:5或57,(ii)SEQ ID NO:11或63和(iii)SEQ ID NO:22、41或74;和(3)具有选自下列的氨基酸序列的VL CDR3:(i)SEQ ID NO:6、45、58、81或96,(ii)SEQ ID NO:17、48、69、86或104和(iii)SEQ ID NO:23、50、75、89或108。

[0124] 在一些实施方式中,本文描述了结合至α5β1整合素的抗体或其片段,其包含全部3个重链互补决定区(CDR)和/或全部3个轻链CDR,其来自:(i)表示为A-15B08的抗体,其包含作为SEQ ID NO:25的VH序列或其人源化变体和作为SEQ ID NO:26的VL序列或其人源化变体;(ii)表示为A2-3B06的抗体,其包含作为SEQ ID NO:42的VH序列或其人源化变体和作为SEQ ID NO:43的VL序列或其人源化变体;(iii)表示为A2-5D10的抗体,其包含作为SEQ ID NO:51的VH序列或其人源化变体和作为SEQ ID NO:52的VL序列或其人源化变体;(iv)表示为A2-7A05的抗体,其包含作为SEQ ID NO:77的VH序列或其人源化变体和作为SEQ ID NO:78的VL序列或其人源化变体;(v)表示为A2-7F01的抗体,其包含作为SEQ ID NO:91的VH序列或其人源化变体和作为SEQ ID NO:92的VL序列或其人源化变体;或者(vi)表示为C-14D12的抗体,其包含作为SEQ ID NO:109的VH序列或其人源化变体和作为SEQ ID NO:110的VL序列或其人源化变体。在一些实施方式中,所述抗体或其片段包含来自表示为A-15B08的抗体的全部三种重链CDR和/或全部三种轻链CDR(根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT)。在一些实施方式中,所述抗体或其片段包含来自表示为A2-3B06的抗体的全部三

种重链CDR和/或全部三种轻链CDR(根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT)。在一些实施方式中,所述抗体或其片段包含来自表示为A2-5D10的抗体的全部三种重链CDR和/或全部三种轻链CDR(根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT)。在一些实施方式中,所述抗体或其片段包含来自表示为A2-7A05的抗体的全部三种重链CDR和/或全部三种轻链CDR(根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT)。在一些实施方式中,所述抗体或其片段包含来自表示为A2-7F01的抗体(根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT)的全部三种重链CDR和/或全部三种轻链CDR。在一些实施方式中,所述抗体或其片段包含来自表示为C-14D12的抗体(根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT)的全部三种重链CDR和/或全部三种轻链CDR。在一些实施方式中,所述抗体或其片段与包含下列的抗体或其片段竞争结合:(i)来自表示为A-15B08的抗体的全部三种重链CDR和/或全部三种轻链CDR(参见,例如,表1)、(ii)来自表示为A2-3B06的抗体的全部三种重链CDR和/或全部三种轻链CDR(参见,例如,表2),(iii)来自表示为A2-5D10的抗体的全部三种重链CDR和/或全部三种轻链CDR(参见,例如,表3)或者(iv)来自表示为C-14D12的抗体的全部三种重链CDR和/或全部三种轻链CDR(参见,例如,表6)。在一些实施方式中,所述抗体或其片段与包含下列的抗体或其片段竞争结合:(i)来自表示为A2-7A05的抗体的全部三种重链CDR和/或全部三种轻链CDR(参见,例如,表4)或者(ii)来自表示为A2-7F01的抗体的全部三种重链CDR和/或全部三种轻链CDR(参见,例如,表5)。

[0125] 在一些实施方式中,本文描述了结合至α5β1整合素的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)包含如表1-6中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3氨基酸序列的重链可变(VH)区;和/或(b)包含如表1-6中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3氨基酸序列的轻链可变(VL)区。在一些实施方式中,所述抗体包含含有如表1-6中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3氨基酸序列的重链可变(VH)区。在一些实施方式中,所述抗体包含含有如表1-6中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3氨基酸序列的轻链可变(VL)区。

[0126] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有选自SEQ ID NO:1、7、12、13和18的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有选自SEQ ID NO:2、8、14、19和24的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有选自SEQ ID NO:3、9、15和20的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有选自SEQ ID NO:4、10、16和21的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有选自SEQ ID NO:5、11和22的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有选自SEQ ID NO:6、17和23的氨基酸序列的VL CDR3。

[0127] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0128] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的VL

CDR1;(2)具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0129] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0130] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0131] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0132] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0133] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有选自SEQ ID NO:27、31、34、35和38的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有选自SEQ ID NO:8、14、19、24和28的氨基酸序列的VHCDR2;和(3)具有选自SEQ ID NO:29、32、36和39的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有选自SEQ ID NO:30、33、37和40的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有选自SEQ ID NO:5、11和41的氨基酸序列的VL CDR2,和(3)具有选自SEQ ID NO:6、17和23的氨基酸序列的VL CDR3。

[0134] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0135] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0136] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0137] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的VH CDR1,(2)具有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0138] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0139] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VL CDR3,

[0140] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有选自SEQ ID NO:1、7、12、13和18的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有选自SEQ ID NO:2、8、14、19和24的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有选自SEQ ID NO:3、9、15和20的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有选自SEQ ID NO:44、46、47和49的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有选自SEQ ID NO:5、11和22的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有选自SEQ ID NO:45、48和50的氨基酸序列的VL CDR3。

[0141] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链

可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0142] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0143] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0144] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0145] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0146] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0147] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有选自SEQ ID NO:53、59、64、65和70的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有选自SEQ ID NO:54、60、66、71和76的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有选自SEQ ID NO:55、61、67和72的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有选自SEQ ID NO:56、62、68和73的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有选自SEQ ID NO:57、63和74的氨基酸序列的VL CDR2,和(3)具有选自SEQ ID NO:58、69和75的氨基酸序列的VL

CDR3。

[0148] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0149] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:61所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0150] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0151] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:66所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:69所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0152] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0153] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0154] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有选自SEQ ID NO:53、59、64、65和70的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有

选自SEQ ID NO:79、82、84、87和90的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有选自SEQ ID NO:80、83、85和88的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有选自SEQ ID NO:56、62、68和73的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有选自SEQ ID NO:57、63和74的氨基酸序列的VL CDR2,和(3)具有选自SEQ ID NO:81、86和89的氨基酸序列的VL CDR3。

[0155] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:80所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:81所示的氨基酸序列的VL CDR3,

[0156] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:59所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:81所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0157] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:79所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:80所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:81所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0158] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:84所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0159] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:87所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:88所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:89所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0160] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:90所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:80所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列的VL

CDR1;(2)具有SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:81所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0161] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有选自SEQ ID NO:93、97、100、101和105的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有选自SEQ ID NO:8、14、19、24和28的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有选自SEQ ID NO:94、98、102和106的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有选自SEQ ID NO:95、99、103和107的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有选自SEQ ID NO:5、11和22的氨基酸序列的VL CDR2,和(3)具有选自SEQ ID NO:96、104和108的氨基酸序列的VL CDR3。

[0162] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:93所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:94所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:95所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0163] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:97所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:98所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:99所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0164] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:100所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:94所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:95所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0165] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:101所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:102所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:103所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:104所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0166] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:105所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:106所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:107所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:108所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0167] 在一些实施方式中,本文描述了抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有SEQ ID NO:93所示的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:94所示的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有SEQ ID NO:95所示的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0168] 在一些实施方式中,本文描述了包含本文所描述的VH区和/或VL区的抗体,其还包含人框架序列。在一些实施方式中,所述VH区和/或VL区还包含框架1(FR1)、框架2(FR2)、框架3(FR3)和/或框架4(FR4)序列。

[0169] 在一些实施方式中,本文所述的抗体是单克隆抗体。在一些实施方式中,所述单克隆抗体是人源化抗体、人抗体或嵌合抗体。在一些实施方式中,本文所述的抗体是Fab、Fab′、F(ab′)$_2$、Fv、scFv、(scFv)$_2$、单链抗体分子、双重可变区抗体、单可变区抗体、线性抗体、V区或者由抗体片段形成的多重特异性抗体。

[0170] 在一些实施方式中,本文所公开的CDR包括来源于相关抗体组的共有序列(参见,例如,表1-6)。如本文所描述的,“共有序列”是指具有在一些序列中常见的保守氨基酸和在给定氨基酸序列内改变的可变氨基酸的氨基酸序列。所提供的示例性CDR共有序列包括对应于CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和/或CDRL3的CDR。α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)的CDR的示例性共有序列如图2A和2B所示。在一些实施方式中,本文所公开的CDR包括来源于相关抗体组的示例性共有序列(参见,例如,表1-6,包括,例如,来自表1、2、3和6的第一示例性组和来自表4和5的第二示例性组)。图2A和2B中显示了α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)的CDR的示例性共有序列。因此,在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有氨基酸序列GFSLTX$_1$YGVH(SEQ ID NO:120)的VH CDR1,其中X$_1$是天然存在的氨基酸(例如,S、T或D);(2)具有氨基酸序列VIWSDGSTTYX1SX$_2$LKS(SEQ ID NO:121)的VH CDR2,其中X$_1$和/或X$_2$分别(或任一个)独立地为天然存在的氨基酸(例如,X$_1$是N、Q、S或A和/或X$_2$是A或T);和(3)具有H X$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$X$_6$X$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$Y(SEQ ID NO:122)或HX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$X$_6$X$_7$X$_8$X$_9$RYDALX10Y(SEQ ID NO:1 23)的氨基酸序列的VH CDR3,其中X$_1$、X$_2$、X$_3$、X$_4$、X$_5$、X$_6$、X$_7$、X$_8$、X$_9$和/或X$_{10}$分别(或任一个)独立地为天然存在的氨基酸(例如,X$_1$是Y、G或A,X$_2$是D、G或P,X$_3$是Y、L或S,X4是D、L或F,X$_5$是G、R或I,X$_6$是D或R,X$_7$是W、D或Y,X$_8$是F、A或G,X$_9$不存在、为M或S,和/或X$_{10}$是D或A;和/或(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有氨基酸序列TASSX$_1$VX$_2$SX$_3$X$_4$X$_5$H(SEQ ID NO:124)的VL CDR1,其中X$_1$、X$_2$、X$_3$、X$_4$和/或X$_5$分别(或任一个)独立地为天然存在的氨基酸(例如,X$_1$是R或S,X$_2$是S或T,X$_3$是N、R或S,X$_4$是S、F、C、A或V,和/或X$_5$是L或F);(2)具有氨基酸序列STSNLAS(SEQ ID NO:125)的VL CDR2;和(3)具有氨基酸序列HQYX$_1$RSPPT(SEQ ID NO:126)的VL CDR3,其中X$_1$是天然存在的氨基酸(例如,L、Y或H)。因此,在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体,如双重特异性抗体)包含(a)重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有氨基酸序列GYTFTIYWIN(SEQ ID NO:127)的VH CDR1;(2)具有氨基酸序列X$_1$IYPGSX$_2$STX$_3$YNEKFKX$_4$(SEQ ID NO:128)的VH CDR2,其中X$_1$、X$_2$、X$_3$和/或X$_4$分别(或任一个)为天然存在的氨基酸(例如,X$_1$是K或N,X$_2$是I或S,X$_3$是D或N,和/或X$_4$是S或T);和(3)具有TGTGGX$_1$AY(SEQ ID NO:129)的氨

基酸序列的VH CDR3,其中X_1是天然存在的氨基酸(例如,X_1不存在、为L或F);和/或(b)轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有氨基酸序列RASSSVNYMY(SEQ ID NO:130)的VL CDR1;(2)具有氨基酸序列FTSSLAP(SEQ ID NO:131)的VL CDR2;和(3)具有氨基酸序列QQX_1TX_2SPFT(SEQ ID NO:132)的VL CDR3,其中X_1和/或X_2分别(或任一个)为天然存在的氨基酸(例如,X_1是F或L和/或X_2是T或G)。

[0171] 在一些实施方式中,本文描述了结合至与本文所描述的抗体中的任一种的抗体或其片段基本相同的表位的结合剂(例如,抗体)。在一些实施方式中,本文描述了与本文所描述的任一种的抗体或其片段竞争性地与人α5β1整合素结合的结合剂(例如,抗体)。在一些实施方式中,所述结合剂是抗体或其片段。

[0172] 在某些方面,可以所述Kabat系统确定α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂的CDR(Kabat等人(1971)Ann.NY Acad.Sci.190:382-391和Kabat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)。

[0173] 在某些方面,可以根据Chothia系统确定α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂的CDR,其在本文中将被称为"Chothia CDR"(参见,例如,Chothia and Lesk,1987,J.Mol.Biol.,196:901-917;Al-Lazikani等人,1997,J.Mol.Biol.,273:927-948;Chothia等人,1992,J.Mol.Biol.,227:799-817;Tramontano A等人,1990,J.Mol.Biol.215(1):175-82;和美国专利No.7,709,226)。

[0174] 在某些方面,可以根据ImMunoGeneTics(IMGT)系统确定α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂的CDR,其将在本文中称为"IMGT CDR",例如,如Lefranc,M.-P.,1999,The Immunologist,7:132-136和Lefranc,M.-P.等人,1999,Nucleic Acids Res.,27:209-212中所述。

[0175] 在某些方面,可以根据AbM系统确定α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂的CDR,其在本文中将被称为"AbM CDR",例如,如MacCallum等人,1996,J.Mol.Biol.,262:732-745中所述。还参见,例如,Martin,A.,"Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains,"in Antibody Engineering,Kontermann and Dübel主编,第31章,第422-439页,Springer-Verlag,Berlin(2001)。

[0176] 在某些方面,可以根据Contact系统确定α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂的CDR,其将在本文中称为"Contact CDR"(参见,例如,MacCallum RM等人,1996,J Mol Biol 5:732-745)。Contact CDR基于可得的复合物晶体结构的分析。

[0177] 在一些实施方式中,一个或多个CDR沿本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂的VH(例如,CDR1、CDR2或CDR3)和/或VL(例如,CDR1、CDR2或CDR3)区的位置(参见,例如,表1-6中根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的CDR)可以改变1、2、3、4、5或6个氨基酸位置(例如,一个或多个氨基酸修饰),只要维持与α5β1整合素(例如,人α5β1整合素)的结合(例如,基本维持,例如,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)。例如,在一些实施方式中,可以通过相对于当前CDR位置,将CDR的N末端和/或C-末端边界迁移1、2、3、4、5或6个氨基酸来改变限定根据表1、2、3、4、5或6中任一个的CDR(根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT)的位置,只要维持与α5β1整合素(例如,人α5β1整合素)的结合(例如,基本维持,例如,至少50%、至少60%、至少

70％、至少80％、至少90％、至少95％)。在其它实施方式中,一个或多个CDR沿本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂的VH(例如,CDR1、CDR2或CDR3)和/或VL(例如,CDR1、CDR2或CDR3)区的长度(参见,例如,表1-6中根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的CDR)可以改变1、2、3、4、5或更多个氨基酸(例如,更短或更长),只要维持与α5β1整合素(例如,人α5β1整合素)的结合(例如,基本维持,例如,至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％)。例如,在一些实施方式中,本文所描述的VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3可以比SEQ ID NO:1-24、27-41、44-50、53-76、79-90和93-108所描述的一个或多个CDR(根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT)短1、2、3、4、5或更多个氨基酸,只要维持与α5β1整合素(例如,人α5β1整合素)的结合(例如,基本维持,例如,至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％)。在其它实施方式中,本文所描述的VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3可以比SEQ ID NO:1-24、27-41、44-50、53-76、79-90和93-108所描述的一个或多个CDR(根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT)长1、2、3、4、5或更多个氨基酸,只要维持与α5β1整合素(例如,人α5β1整合素)的结合(例如,基本维持,例如,至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％)。在其它实施方式中,与SEQ ID NO:1-24、27-41、44-50、53-76、79-90和93-108所描述的一个或多个CDR(根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT)相比,本文所描述的VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3的氨基末端可以延长1、2、3、4、5或更多个氨基酸,只要维持与α5β1整合素(例如,人α5β1整合素)的结合(例如,基本维持,例如,至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％)。在其它实施方式中,与SEQ ID NO:1-24、27-41、44-50、53-76、79-90和93-108所描述的一个或多个CDR(根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT)相比,本文所描述的VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3的羧基末端可以延长1、2、3、4、5或更多个羧基酸,只要维持与α5β1整合素(例如,人α5β1整合素)的结合(例如,基本维持,例如,至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％)。在其它实施方式中,与SEQ ID NO:1-24、27-41、44-50、53-76、79-90和93-108所描述的一个或多个CDR(根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT)相比,本文所描述的VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3的氨基末端可以缩短1、2、3、4、5或更多个氨基酸,只要维持与α5β1整合素(例如,人α5β1整合素)的结合(例如,基本维持,例如,至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％)。在一些实施方式中,与SEQ ID NO:1-24、27-41、44-50、53-76、79-90和93-108所描述的一个或多个CDR(根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT)相比,本文所描述的VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3的羧基末端可以缩短1、2、3、4、5或更多个氨基酸,只要维持与α5β1整合素(例如,人α5β1整合素)的结合(例如,基本维持,例如,至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％)。本领域中已知的任何方法可以用于确定是否维持与α5β1整合素(例如,人α5β1整合素)的结合,例如,本文所描述的“实施例”节中所描述的结合测定和条件。例如:本文所描述的实施例2描述了用于测量与α5β1整合素(例如,人α5β1整合素)的结合的测定。

[0178] 在其它实施方式中,本文所提供的结合至α5β1整合素的α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含保守序列修饰(例如,如以上所描述的一个或多个CDR中一个或多个氨基酸的修饰)。对于作为α5β1整合素结合剂(例如,抗体),如人α5β1整合素结合剂的多肽,保守序列修饰包括保守氨基酸替换,其包括其中所述氨基酸残基被具有类

似侧链的氨基酸残基替换的那些替换。在本领域中定义了具有类似侧链的氨基酸残基家族。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,门冬氨酸、谷氨酸)、不带电的极性侧链(例如,甘氨酸、天门冬酰胺、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、蛋氨酸)、β-支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳烃侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,在一些实施方式中,用来自相同侧链家族的另一种氨基酸残基替换α5β1整合素结合剂中预测的非必需氨基酸残基。识别不消除抗原结合的核苷酸和氨基酸保守替换的方法在本领域中是熟知的(参见,例如,Brummell等人,Biochem.32:1180-1187(1993);Kobayashi等人Protein Eng.12(10):879-884(1999);和Burks等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:412-417(1997))。在一些实施方式中,核苷酸和氨基酸序列修饰是指对表1、表2、表3、表4、表5或表6中所述的CDR的至多1、2、3、4、5或6个氨基酸替换。因此,例如,每种这种CDR可以含有至多5个保守氨基酸替换,例如,至多(不超过)4个保守氨基酸替换,例如,至多(不超过)3个保守氨基酸替换,例如,至多(不超过)2个保守氨基酸替换,或者不超过1个保守氨基酸替换。

[0179] 本发明公开提供了本文所描述的抗体(参见,例如,表1、表3)的变体。以下实施例8中所描述的表示为A-15B08-T62A的抗体是这种示例性抗体变体。通过用丙氨酸替换抗体A-15B08的CDRH2中位置62处的苏氨酸残基以除去假定的N-糖基化位点来产生A-15B08-T62A。图2C和2D中显示了根据A-15B08-T62A的多种编号方案的VH、VL和CDR序列。更具体地,表示为A-15B08-T62A的抗体包含含有SEQ ID NO:135所示的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的VL。图2C和2D中显示了根据Kabat、AbM、Chothia、Contact和IMGT的A-15B08-T62A的6个CDR序列。

[0180] 在一些实施方式中,本文所提供的α5β1整合素结合剂包含含有如包含SEQ ID NO:135所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3的VH。在一些实施方式中,本文所提供的α5β1整合素结合剂包含含有如包含SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的VL。在一些实施方式中,本文所提供的α5β1整合素结合剂包含含有如包含SEQ ID NO:135所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3的VH;和含有如包含SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的VL。在一些实施方式中,CDR根据Kabat编号。在一些实施方式中,CDR根据AbM编号。在一些实施方式中,CDR根据Chothia编号。在一些实施方式中,CDR根据Contact编号。在一些实施方式中,CDR根据IMGT。在一些实施方式中,CDR根据选自Kabat、AbM、Chothia、Contact和IMGT的两种或更多种编号方案的组合。

[0181] 在一些实施方式中,本文所提供的抗体或其片段包含含有与SEQ ID NO:135具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列的VH,和与SEQ ID NO:26具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列的VL,并且维持了抗体或其片段与α5β1整合素(例如,人α5β1整合素)的结合(例如,基本维持,例如,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)。

[0182] 在一些实施方式中,本文所提供的抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:135所示的氨基酸序列的VH,和含有SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的VL。

[0183] 如果需要,将α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂(直接或

间接)连接或缀合至具有效应功能,如细胞毒活性的部分(例如,化疗部分或放射性同位素)或具有免疫招募活性的部分以形成抗体-药物缀合物(ADC)。连接或缀合(直接或间接)的部分包括细胞毒的或非细胞毒的药物。作为另外一种选择或另外,任选地将α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂连接或缀合(直接或间接)至辅助从混合物分离的部分(例如,标签)或者具有报告分子活性的部分(例如,检测标签或报告蛋白)。将理解本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂的特征还延伸至包含α5β1整合素结合剂片段的多肽。

[0184] 在一些实施方式中,将本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂缀合或重组连接(直接或间接)至治疗剂(例如,细胞毒性剂)或者连接至诊断试剂或可检测试剂(例如,标记的试剂,包括标记的抗体)。缀合或重组连接的抗体可以是有用的,例如,用于诊断、治疗和/或预防α5β1整合素-介导的疾病、病症和病况,包括癌症(例如,与表达或过表达α5β1整合素的肿瘤细胞有关或以之为特征的癌症)、血管生成-介导的疾病(例如,与异常血管生成有关或以之为特征的疾病)和炎性疾病(例如,神经炎性疾病,包括MS和和ALS)。

[0185] 可以通过将α5β1整合素结合剂(例如,抗体)偶联至可检测物质(例如,标记的试剂,包括标记的抗体)来完成包括使用诊断试剂和/或可检测试剂的这种诊断和/或检测,所述可检测物质包括(例如)酶,其包括(但不限于)辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;辅基,其包括(但不限于)抗生蛋白链菌素/生物素或抗生物素蛋白/生物素;荧光物质,其包括(但不限于)伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料,其包括(但不限于)鲁米诺;生物发光材料,其包括(但不限于)荧光素酶、萤光素或水母发光蛋白;化学发光材料,其包括(但不限于)吖啶鎓基化合物或HALOTAG;放射性物质,其包括(但不限于)碘(131I、125I、123I和121I)、碳(14C)、硫(35S)、氚(3H)、铟(115In、113In、112In和111In)、锝(99Tc)、铊(201Ti)、镓(68Ga和67Ga)、钯(103Pd)、钼(99Mo)、氙(133Xe)、氟(18F)、153Sm、177Lu、159Gd、149Pm、140La、175Yb、166Ho、90Y、47Sc、186Re、188Re、142Pr、105Rh、97Ru、68Ge、57Co、65Zn、85Sr、32P、153Gd、169Yb、51Cr、54Mn、75Se、113Sn或117Sn;使用多种正电子发射断层术的正电子发射金属;和非放射性顺磁性金属离子。

[0186] 特异性结合至α5β1整合素的标记的试剂(例如,标记的抗体)可以用于诊断目的以检测、诊断或监测α5β1整合素-介导的疾病、病症或病况。本文描述了用于检测α5β1整合素-介导的疾病、病症或病况的方法,其包括:(a)使用特异性结合至α5β1整合素的如本文所描述的一种或多种α5β1整合素结合剂(例如,抗体)测定受试者的细胞或组织样品中α5β1整合素的表达;和(b)将α5β1整合素的水平与对照水平(例如,如来自未患有α5β1整合素-介导的疾病、病症或病况的患者或者来自疾病发生前的相同患者的正常组织样品中的水平)相比较,其中与α5β1整合素的对照水平相比,α5β1整合素的测定水平的升高指示了α5β1整合素-介导的疾病、病症或病况。本文还描述了用于诊断α5β1整合素-介导的疾病、病症或病况的诊断测定,其包括:(a)使用特异性结合至α5β1整合素的如本文所描述的一种或多种α5β1整合素结合剂(例如,抗体)测定个体的细胞或组织样品中α5β1整合素的水平;和(b)将α5β1整合素的水平与对照水平(例如,正常组织样品中的水平)相比较,其中与α5β1整合素的对照水平相比,测定的α5β1整合素水平的升高指示了α5β1整合素-介导的疾病、病症或病况。在

某些实施方式中,本文描述了治疗受试者中α5β1整合素-介导的疾病、病症或病况的方法,其包括:(a)使用特异性结合至α5β1整合素的如本文所描述的一种或多种α5β1整合素结合剂(例如,抗体)测定受试者的细胞或组织样品中α5β1整合素的水平;和(b)将α5β1整合素的水平与对照水平(例如,正常组织样品中的水平)相比较,其中与α5β1整合素的对照水平相比,测定的α5β1整合素水平的升高指示了α5β1整合素-介导的疾病、病症或病况。在一些实施方式中,所述方法还包括(c)向鉴别为患有α5β1整合素-介导的疾病、病症或病况的受试者施用有效量的本文中的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)。α5β1整合素-介导的疾病、病症或病况的更确定的诊断可以允许医疗专业人员更早使用预防措施或侵袭性治疗,借此防止α5β1整合素-介导的疾病、病症或病况的发生或者进一步发展。

[0187] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂是试剂盒中的组分。在一些实施方式中,试剂盒包括包装到适当包装材料中的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)或者包含α5β1整合素结合剂(例如,抗体)的组合物(例如,药物组合物)。试剂盒任选地包括标签或包装说明书,其包括对组分的描述,或者其中组分的体外、体内或离体使用的说明书。

[0188] 本文还描述了重组连接或缀合(共价或非共价缀合,直接或间接)至异源蛋白质或多肽(或其片段,例如,至多肽(例如,约10、约20、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90或约100个氨基酸)以产生融合蛋白的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)及其用途。具体地,本文描述了融合蛋白,其包含本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂的抗原-结合片段(例如,包含VH和/或VL的CDR1、CDR2和/或CDR3)和异源蛋白质、多肽或肽。在一些实施方式中,α5β1整合素结合剂(例如,抗体)所连接至的异源蛋白质、多肽或肽对于将α5β1整合素结合剂靶向特定细胞(例如,α5β1整合素表达细胞,包括肿瘤细胞)是有用的。

[0189] 此外,可以将本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂(直接或间接)连接至标志物或“标签”序列,如肽,以辅助纯化。在一些实施方式中,所述标志物或标签氨基酸序列是六组氨酸肽,如pQE载体(参见,例如,QIAGEN,Inc.)中所提供的标签等,它们中的多个是可商购的。例如,如Gentz等人,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:821-24中所述,六组氨酸提供了方便的融合蛋白的纯化。用于纯化的其它肽标签包括(但不限于)血球凝集素(“HA”)标签,其对应于来源于流感血球凝集素蛋白的表位(Wilson等人,1984,Cell 37:767-78)和“FLAG”标签。

[0190] 用于将部分(包括多肽)(直接或间接)连接或缀合至抗体的方法在本领域中是熟知的,所述方法中的任一种可以用于制备本文所描述的抗体-药物缀合物或融合蛋白。

[0191] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)是融合蛋白。如本文所使用的术语“融合蛋白”是指包含结合剂(例如,抗体)的氨基酸序列和异源多肽或蛋白(例如,通常不是抗体(例如,非α5β1整合素结合抗体)的一部分的多肽或蛋白)的氨基酸序列的多肽。在一些实施方式中,融合蛋白保留了α5β1整合素结合剂的生物活性。在一些实施方式中,融合蛋白包含α5β1整合素抗体VH区、VL区、VH CDR(1、2或3个VH CDR)和/或VL CDR(1、2或3个VL CDR),其中所述融合蛋白结合至α5β1整合素表位、α5β1整合素片段和/或α5β1整合素多肽。

[0192] 可以(例如)通过基因改组、基序改组、外显子改组和/或密码子改组(统称为“DNA

改组”)的技术产生融合蛋白。可以使用DNA改组改变如本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂的活性,所述α5β1整合素结合剂包括(例如)具有高亲和力和低解离速率的α5β1整合素结合剂。在一些实施方式中,可以在重组之前通过经由易错PCR、随机核苷酸插入或其它方法所进行的随机突变来改变α5β1整合素结合剂,包括人α5β1整合素结合剂。编码本文所描述的α5β1整合素结合剂的多核苷酸可以与一种或多种异源分子的一种或多种组分、基序、部分(section)、部分(part)、域、片段等重组。

[0193] 本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂还可以附接至固体载体,其对于靶标抗原的免疫测定或纯化是有用的。这些固体载体包括(但不限于)玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0194] 本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂还可以(直接或间接)连接或缀合至第二抗体以形成抗体异源缀合物。

[0195] 所述接头可以是“可切割部分”,其辅助连接或缀合的试剂在细胞中的释放,但是在本文中也考虑了不可切割接头。用于在本发明公开的缀合物(例如,抗体-药物缀合物)中使用的接头无限制地包括酸不稳定的接头(例如,腙接头)、含二硫键的接头、肽酶敏感接头(例如,包含氨基酸,例如,缬氨酸和/或瓜氨酸的肽接头,如瓜氨酸-缬氨酸或苯丙氨酸-赖氨酸)、对光不稳的接头、二甲基接头、硫醚接头或者设计以逃避多药转运体-介导的抗性的亲水性接头。

[0196] 可以使用多种双官能蛋白偶联剂制备抗体和试剂的缀合物,包括其中所述试剂是用于制备ADC的药物的情况,所述偶联剂如BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC、磺基-SMPB和SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基砜)苯甲酸酯)。本发明公开还考虑可以使用如本领域所公开的任何适合的方法制备抗体和试剂的缀合物,包括其中所述试剂是用于制备ADC的药物的情况(参见,例如,Bioconjugate Techniques(Hermanson主编,第2版.2008))。

[0197] 抗体和试剂的常规缀合策略,包括其中所述试剂是用于制备ADC的药物的情况,已基于涉及Lys残基的ε氨基或Cys残基的硫醇基团的随机缀合化学,其导致产生了不均一的缀合物。最近发展的技术允许位点-特异性缀合至抗体,其导致均一负载并且避免了具有改变的抗原-结合或药物动力学的缀合物亚组。这些包括“硫醇单抗(thiomabs)”的工程化,所述硫醇单抗在重链和轻链上提供反应性硫醇基团的位置处包含半胱氨酸替换,并且这些不破坏免疫球蛋白折叠和组装或者改变抗原。在另一种方法中,通过从硒代半胱氨酸插入末端重编码终止密码子UGA将硒代半胱氨酸共翻译插入到抗体序列中,从而允许在存在其它天然氨基酸的情况下在硒代半胱氨酸的亲核硒醇基团处进行位点特异性共价缀合。

[0198] 在一些实施方式中,将本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂缀合至细胞毒性剂。在一些实施方式中,可以任选地将本文所公开的α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂与本文所公开的或本领域中已知的一种或多种细胞毒性剂缀合以产生ADC。在一些实施方式中,所述细胞毒性剂是化疗剂,其包括(但不限于)甲氨蝶呤、亚德里亚霉素、多柔比星、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、柔红霉素或其它插入剂。在一些实施方式中,所述细胞毒性剂是细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素或其片段,其包括(但不限于)白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A

链、篦麻毒素A链、相思豆毒蛋白A链、蒴莲素(modeccin)A链、α-八叠球菌素、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆(Phytolaca americana)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(Momordica charantia)抑制剂、泻果素、巴豆毒蛋白、肥皂草(Sapaonaria officinalis)抑制剂、白树毒素、丝裂吉菌素(mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素和单端孢霉烯。在一些实施方式中,所述细胞毒性剂是放射性同位素以生产放射性缀合物或放射性缀合的试剂。多种放射性核素对于放射性缀合的试剂的产生是可用的,其包括(但不限于)90Y、125I、131I、123I、111In、131In、105Rh、153Sm、67Cu、67Ga、166Ho、177Lu、186Re、188Re和212Bi。还可以使用多肽或分子和一种或多种小分子毒素,如卡里奇霉素(calicheamicin)、美登素、单端孢霉烯和CC1065的缀合物以及具有毒素活性的这些毒素的衍生物。使用多种双官能蛋白-偶联剂制备多肽或分子和细胞毒性剂的缀合物,所述偶联剂如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物(如二甲基己二亚酰胺化物HCL)、活性酯(如二琥珀酰亚胺基辛二酸)、醛(如戊二醛)、双叠氮基化合物(如双(p-叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(如双-(p-二重氮基苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

[0199] 在一些实施方式中,将本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂缀合至药物,如信号转导调节剂、促凋亡试剂、有丝分裂抑制剂、抗-肿瘤抗生素、免疫调节剂、用于基因疗法的核酸、烷化剂、抗血管生成剂、抗代谢产物、含硼试剂、化学保护剂、激素试剂、抗激素试剂、皮质类固醇、光活性治疗剂、寡核苷酸、放射性核素试剂、放射致敏剂、局部异构酶抑制剂和酪氨酸激酶抑制剂。在一些实施方式中,所述有丝分裂抑制剂是尾海兔素、奥瑞他汀、美登素和植物碱。在一些实施方式中,所述药物是尾海兔素、奥瑞他汀、美登素和植物碱。奥瑞他汀的实例是单甲基澳瑞他汀F(MMAF)或者单甲基澳瑞他汀E(MMAE)。美登素的实例包括(但不限于)DM1、DM2、DM3和DM4。在一些实施方式中,抗肿瘤抗生素选自放线菌素、蒽环类抗生素、卡里奇霉素(calicheamicin)和倍癌毒素。在一些实施方式中,放线菌素是吡咯并苯二氮卓(PBD)。

[0200] 如本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂可以是单特异性、双重特异性、三重特异性的或者具有更多重特异性。这些试剂可以包括抗体。多重特异性抗体,如双重特异性抗体是对于至少两种不同靶标(例如,α5β1整合素和和αv整合素)或者相同靶标上的两种不同表位具有结合特异性的单克隆抗体(例如,抗α5β1整合素的双重特异性抗体,其具有α5β1整合素的第一表位的第一结合域和α5β1整合素的第二表位的第二结合域)。在一些实施方式中,可以基于本文所描述的抗体的序列,例如,表1、表2、表3、表4、表5和/或表6中的CDR序列构建多重特异性(例如,双重特异性)抗体。在一些实施方式中,本文所描述的多重特异性抗体是双重特异性抗体。在一些实施方式中,双重特异性抗体是小鼠、嵌合、人或人源化抗体。在一些实施方式中,多重特异性抗体的结合特异性之一是对于α5β1整合素的并且其它对于任何其它靶标(例如,αvβ3整合素)。在一些实施方式中,多重特异性(例如,双重特异性)抗体可以包含不止一种靶标(例如,抗原)结合结构域,其中不同的结合结构域对于不同靶标特异(例如,结合至α5β1整合素的第一结合域和结合另一种靶标(例如,αvβ3整合素)的第二结合域)。在一些实施方式中,多重特异性(例如,双重特异性)抗体分子可以结合相同靶标(例如,α5β1整合素)上的不止一种(例如,两种或更多种)表位。

[0201] 用于制备多重特异性抗体的方法在本领域中是已知的,如通过两种免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中2条重链具有不同的特异性(参见,例如,Milstein and Cuello,1983,Nature 305:537-40)。有关产生多重特异性抗体(例如,双重特异性抗体)的其它详细信息,参见,例如,Bispecific Antibodies(Kontermann主编,2011)。

[0202] 多重特异性抗体的示例性结构在本领域中是已知的并且进一步描述于Weidle等人,2013,Cancer Genomics&Proteomics 10:1-18;Brinkman等人,2017,MABS,9:2,182-212;Godar等人,2018,Expert Opinion on Therapeutic Patents,28:3,251-276;和Spiess等人,2015,Mol.Immunol.6795-106。

[0203] 例如,双重特异性抗体分子可以分为不同的结构组:(i)双重特异性免疫球蛋白G(BsIgG);(ii)附有其它抗原-结合部分的IgG;(iii)双重特异性抗体片段;(iv)双重特异性融合蛋白;和(v)双重特异性抗体缀合物。作为非限制性实例,BsIgG形式可以包括crossMab、DAF(二合一)、DAF(四合一)、DutaMab、DT-IgG、杵臼结构共有LC(knobs-in-holes common LC)、杵臼结构组件(knobs-in-holes assembly)、电荷对、Fab-臂交换、SEEDbody、三功能抗体(triomab)、LUZ-Y、Fcab、Kλ-体、正交Fab。

[0204] 在一些实施方式中,BslgG包含对于杂二聚化工程化的重链。例如,可以使用"杵臼结构"策略、SEED平台、常见重链(例如,在κλ-体中)以及异源二聚Fc区的使用将重链对于异源二聚化进行工程化。避免BsIgG中同源二聚体重链配对的策略在本领域中是已知的,其包括杵臼结构、duobody、azymetric、电荷对、HA-TF、SEEDbody和差异蛋白A亲和力。

[0205] 双重特异性抗体的另一种形式是附有其它抗原结合部分的IgG。例如,通过将其它抗原结合单元附加到单特异性IgG上(例如,在重链或轻链任一个的N末端或C末端)可以将单特异性IgG工程化以具有双重特异性。示例性的其它抗原结合单元包括单结构域抗体(例如,可变重链或可变轻链)、工程化蛋白骨架和配对的抗体可变结构域(例如,单链可变片段或可变片段)。附加的IgG形式的非限制性实例包括双可变结构域IgG(DVD-Ig)、IgG(H)-scFv、scFv-(H)IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)IgG、IgG(L,H)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig、zybody和DVI-IgG(四合一)。参见Spiess等人Mol.Immunol.67(2015):95-106。在一些实施方式中,示例性抗体形式是(例如)国际专利申请公开No.WO 2018/075692和美国专利申请公开No.2018/0118811中所描述的单特异性或多重特异性(例如,双重特异性抗体)的B-体形式。

[0206] 双重特异性抗体片段(BsAb)是缺少一些或全部抗体恒定结构域的双重特异性抗体分子形式。例如,一些BsAb缺少Fc区。在一些实施方式中,双重特异性抗体片段包括通过允许BsAb在单个宿主细胞中有效表达BsAb的肽接头连接的重链和轻链区。双重特异性抗体片段的非限制性实例包括(但不限于)纳米抗体、纳米抗体-HAS、BiTE、双链抗体、DART、TandAb、sc双链抗体、sc双链抗体-CH3、双链抗体-CH3、三抗体(triple body)、微型抗体、微抗体、TriBi微抗体、scFv-CH3 KIH、Fab-scFv、scFv-CH-CL-scFv、$F(ab')_2$、$F(ab')_2$-scFv2、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四价HCAb、sc双链抗体-Fc、双链抗体-Fc、串联scFv-Fc和胞内抗体。

[0207] 双重特异性融合蛋白包括连接至其它蛋白的抗体片段。例如,双重特异性融合蛋白可以连接至其它蛋白以增加其它特异性和/或功能性。在一些实施方式中,对接锁定(dock-and-lock,DNL)方法可以用于产生具有更高效价的双重特异性抗体分子。此外,与白

蛋白结合蛋白或人血清白蛋白的双重特异性抗体融合蛋白可以延长抗体片段的血清半衰期。在一些实施方式中,化学缀合,例如,抗体和/或抗体片段的化学缀合可以用于产生BsAb分子。示例性双重特异性抗体缀合物包括CovX体形式,其中低分子量药物与每个Fab臂或抗体或其片段中的单个反应性赖氨酸位点特异性缀合。在一些实施方式中,缀合改善了血清半衰期。

[0208] 多重特异性抗体,包括双重特异性抗体的产生方法在本领域中是已知的。例如,可以通过组分抗体在不同宿主细胞中的单独表达以及后续纯化/组装或者通过组分抗体在单一宿主细胞中的表达来产生多重特异性抗体,包括双重特异性。多重特异性(例如,双重特异性)抗体分子的纯化的可以通过本领域中已知的多种方法,包括亲合色谱法进行。

[0209] 在一些实施方式中,可以以本文所公开的或本领域中已知的任何抗体形式提供本文所公开的α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂。作为非限制性实例,在一些实施方式中,α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂可以选自Fab串联lg(FIT-lg);DVD-lg;杂交杂交瘤(四源杂交瘤(quadroma)或四体杂交瘤(tetradoma));抗运载蛋白平台(Pieris);双链抗体;单链双链抗体;串联单链Fv片段;TandAbs,三重特异性Ab(Affimed);Darts双亲和力重靶向剂(Macrogenics);双重特异性Xmabs(Xencor);双重特异性T细胞接合剂(Bites;Amgen;55kDa);三抗体;三抗体=Fab-scFv融合蛋白多功能重组抗体衍生物(CreativeBiolabs);Duobody平台(Genmab);对接锁定平台;杵臼结构(KIH)平台;人源化双重特异性IgG抗体(REGN1979)(Regeneron);Mab2双重特异性抗体(F-Star);DVD-lg=双可变域免疫球蛋白(AbbVie);kappa-lambda体;TBTI=四价双重特异性串联Ig;和CrossMab(Roche)。

[0210] 在一些实施方式中,本文所公开的多重特异性(例如,双重特异性)抗体包含α5β1整合素结合结构域和一个或多个其它结合至非α5β1整合素的一个或多个靶标(例如,αv整合素)的结合结构域。在一些实施方式中,本文所公开的多重特异性(例如,双重特异性)抗体包含α5β1整合素结合结构域,所述α5β1整合素结合结构域包含表1的VH和/或VL氨基酸序列的CDR(根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT)。在一些实施方式中,本文所公开的多重特异性(例如,双重特异性)抗体包含α5β1整合素结合结构域,所述α5β1整合素结合结构域包含表2的VH和/或VL氨基酸序列的CDR(根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT)。在一些实施方式中,本文所公开的多重特异性(例如,双重特异性)抗体包含α5β1整合素结合结构域,所述α5β1整合素结合结构域包含表3的VH和/或VL氨基酸序列的CDR(根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT)。在一些实施方式中,本文所公开的多重特异性(例如,双重特异性)抗体包含α5β1整合素结合结构域,所述α5β1整合素结合结构域包含表4的VH和/或VL氨基酸序列的CDR(根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT)。在一些实施方式中,本文所公开的多重特异性(例如,双重特异性)抗体包含α5β1整合素结合结构域,所述α5β1整合素结合结构域包含表5的VH和/或VL氨基酸序列的CDR(根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT)。在一些实施方式中,本文所公开的多重特异性(例如,双重特异性)抗体包含α5β1整合素结合结构域,所述α5β1整合素结合结构域包含表6的VH和/或VL氨基酸序列的CDR(根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT)。

[0211] 在一些实施方式中,本文描述了多重特异性(例如,双重特异性)抗体,其包含结合至包含如表1所示的VH和VL CDR(例如,根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VH

CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3)的α5β1整合素的结合结构域。在一些实施方式中,本文描述了多重特异性(例如,双重特异性)抗体,其包含结合至包含如表2所示的VH和VL CDR(例如,根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3)的α5β1整合素的结合结构域。在一些实施方式中,本文描述了多重特异性(例如,双重特异性)抗体,其包含结合至包含如表3所示的VH和VL CDR(例如,根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3)的α5β1整合素的结合结构域。在一些实施方式中,本文描述了多重特异性(例如,双重特异性)抗体,其包含结合至包含如表4所示的VH和VL CDR(例如,根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3)的α5β1整合素的结合结构域。在一些实施方式中,本文描述了多重特异性(例如,双重特异性)抗体,其包含结合至包含如表5所示的VH和VL CDR(例如,根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3)的α5β1整合素的结合结构域。在一些实施方式中,本文描述了多重特异性(例如,双重特异性)抗体,其包含结合至包含如表6所示的VH和VL CDR(例如,根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3)的α5β1整合素的结合结构域。

[0212] 可以通过任何适合的方法获得结合α5β1整合素的抗体,所述方法如(但不限于)用包含α5β1整合素和抗体集合的完整肿瘤细胞免疫、重组技术或者使用α5β1整合素胞外域表位的抗体或抗体片段的筛选文库。可以使用多种已知的技术产生单克隆抗体(参见,例如,Coligan等人(主编),Current Protocols in Immunology,1:2.5.12.6.7(John Wiley& Sons 1 991);Monoclonal Antibodies,Hybridomas:A New Dimension in Biological Analyses,Plenum Press,Kennett,McKearn,and Bechtol(主编)(1980);Antibodies:A Laboratory Manual,Harlow and Lane(主编),Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988);和Picksley等人,"Production of monoclonal antibodies against proteins expressed inE.coli,"in DNA Cloning 2:Expression Systems,第2版,Glover等人(主编),第93页(Oxford University Press 1995))。例如,用于产生单克隆抗体的示例性技术包括用人α5β1整合素抗原免疫动物并从采集自所述动物的脾脏细胞产生杂交瘤。杂交瘤可以产生结合α5β1整合素的单克隆抗体或抗体片段。

[0213] 在一些实施方式中,单克隆抗体或抗体片段可以分离自抗体噬菌体文库,包括如本文所描述的抗体噬菌体文库。在一些实施方式中,可以使用(例如)Antibody Phage Display:Methods and Protocols,P.M.O'Brien and R.Aitken主编,Humana Press, Totawa N.J.,2002中所述的技术产生抗体噬菌体文库。在一些实施方式中,可以通过筛选噬菌体文库选择抗体克隆。噬菌体文库可以含有展示融合至噬菌体外壳蛋白的抗体可变区(Fv)的多种片段(例如,Fab、scFv)的噬菌体。对于抗所期望的抗原的抗体筛选这些噬菌体文库。将表达能够结合至所期望的抗原的Fv片段(例如,Fab、scFv)的克隆吸附至抗原,并因此与文库中的非结合克隆分离。然后,从抗原洗脱结合克隆,并通过其它抗原吸附/洗脱循环进一步富集。

[0214] 可以在噬菌体上将可变域功能性地展示为单-链Fv(scFv)片段,其中VH和VL通过短、柔性肽共价连接,或者展示为Fab片段,其中它们分别融合至恒定域并且非共价相互作

用,如(例如)Winter等人,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455(1994)中所述。

[0215] 可以通过聚合酶链反应(PCR)单独克隆VH和VL基因组库,并在噬菌体文库中随机重组,然后可以对其搜索抗原-结合克隆,如(例如)Winter等人,如上中所述。来自免疫源的文库提供了对免疫原具有高亲和力的抗体,且不需要构建杂交瘤。作为另外一种选择,可以克隆天然组库,从而在无任何免疫的情况下提供抗广泛的非自体抗原以及自体抗原的人抗体的单一来源,如(例如)Griffiths等人,EMBOJ,12:725-734(1993)所述。最终,还可以通过从干细胞克隆未重排的V-基因节段并使用含有编码高度可变的CDR3区并实现体外重排的随机序列的PCR引物来合成制备天然文库,如(例如)Hoogenboom and Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388(1992)所述。

[0216] 可以通过本领域中已知的多种技术实现文库筛选。例如,α5β1整合素(例如,α5β1整合素多肽、片段或表位)可以用于涂覆吸附板的孔,在固定至吸附板的宿主细胞上表达或者在细胞分选中使用,或者缀合至生物素用于被抗生蛋白链菌素-涂覆珠捕获,或者在任何其它淘选展示文库的方法中使用。可以通过使用长清洗和一价噬菌体展示来促进通过缓慢溶解动力学(例如,优良结合亲和力)的抗体选择,如Bass等人,Proteins,8:309-314(1990)和在WO 92/09690中所述,和低抗原涂覆密度,如Marks等人,Biotechnol.,10:779-783(1992)中所述。

[0217] 可以通过设计适合的抗原筛选程序来选择所关心的噬菌体克隆,然后使用来自所关心的噬菌体克隆的VH和/或VL序列(例如,Fv序列),或者来自VH和VL序列的多种CDR序列,和Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,NIH Publication 91-3242,Bethesda MD(1991),第1-3卷中所描述的适合的恒定区(例如,Fc)序列构建全长α5β1整合素结合剂(例如,抗体)克隆来获得α5β1整合素结合剂(例如,抗体)。

[0218] 同样地,可以通过一些技术中的任一种产生结合α5β1整合素的人抗体,所述技术包括(但不限于)人周围血液细胞(例如,含有B淋巴细胞)的爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)转化、人B细胞的体外免疫、来自携带插入的人免疫球蛋白基因的免疫的转基因小鼠的脾脏细胞的融合、从人免疫球蛋白V区噬菌体文库的分离,或者如本领域中已知且基于本文中的公开内容的其它程序。从转基因动物获得人抗体的方法进一步描述于(例如)Bruggemann等人,Curr.Opin.Biotechnol.,8:45558,1997;Jakobovits等人,Ann.N.Y.Acad Sci.,764:52535,1995;Green等人,Nature Genet.,7:13-21,1994;Lonberg等人,Nature,368:856-859,1994;Taylor等人,Int.Immun.6:579-591,1994;和美国专利No.5,877,397。

[0219] 例如,结合α5β1整合素的人抗体可以得自已工程化从而对抗原性攻毒响应生产特异性人抗体的转基因动物。例如,国际专利公开No.WO 98/24893公开了具有人Ig基因座的转基因动物,其中由于内源重链和轻链基因座的失活,所述动物不产生功能性内源免疫球蛋白。还已描述了能够对免疫原产生免疫应答的转基因非灵长类哺乳动物宿主,其中所述抗体具有灵长类恒定区和/或可变区,并且其中替换或失活了内源免疫球蛋白编码基因座。例如,国际专利公开No.WO 96/30498公开了在哺乳动物中使用Cre/Lox系统修饰免疫球蛋白基因座,从而替换全部或部分恒定区或可变区以形成修饰的抗体分子。例如,国际专利公开No.WO 94/02602公开了具有失活的内源Ig基因座和功能性人Ig基因座的非人哺乳动物宿主。例如,美国专利No.5,939,598公开了制备转基因小鼠的方法,其中所述小鼠缺少内源重链并且表达包含一个或多个异种恒定区的外源免疫球蛋白基因座。使用转基因动物,如

本文所描述的转基因动物,可以对所选抗原性分子产生免疫应答,并且可以从动物除去抗体产生细胞并将其用于产生分泌人-来源的单克隆抗体的杂交瘤。免疫规程、佐剂等在本领域中是已知的并且用于例如,如(例如)国际专利公开No.WO 96/33735中所描述的转基因小鼠的免疫。可以测试单克隆抗体抑制或中和相应蛋白的生物活性或生理作用的能力。

[0220] 本发明公开提供了结合α5β1整合素,包括人α5β1整合素的人源化抗体。用于人源化非人抗体的多种方法在本领域中是已知的。例如,人源化抗体可以具有来自非人来源的引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为"输入"残基,其通常采集自"输入"可变域。可以使用本领域技术人员已知的技术产生结合α5β1整合素的人源化抗体(例如,Zhang等人,Molecular Immunology,42(12):1445-1451,2005;Hwang等人,Methods,36(1):35-42,2005;Dall'Acqua等人,Methods,36(1):43-60,2005;Clark,Immunology Today,21(8):397-402,2000和美国专利No.6,180,370;6,054,927;5,869,619;5,861,155;5,712,120;和4,816,567。

[0221] 在一些情况下,通过CDR移植(CDR grafting)构建人源化抗体,其中将亲代非人抗体(例如,啮齿类)的6个互补决定区(CDR)的氨基酸序列移植到人抗体框架中。例如,Padlan等人(FASEBJ.9:133-139,1995)确定CDR中仅约三分之一的残基实际接触抗原,并且将这些称为"特异性决定残基"或SDR。在SDR移植技术中,仅将SDR残基移植到人抗体框架中(参见,例如,Kashmiri等人,Methods 36:25-34,2005)。

[0222] 用于制备人源化抗体的人可变域(轻链和重链两者)的选择可以对于降低抗原性是重要的。例如,根据所谓的"最适(best-fit)"法,将非人(例如,啮齿类)抗体的可变域序列对已知的人可变域序列的整个文库进行筛选。可以将最接近啮齿类的人序列选择作为人源化抗体的人框架(参见,例如,Sims等人(1993)J.Immunol.151:2296;Chothia等人(1987)J.Mol.Biol.196:901。另一种方法使用来源于轻链或重链的特定亚群的所有人抗体的共有序列的特定框架。相同框架可以用于几种不同的人源化抗体(参见,例如,Carter等人(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285;Presta等人(1993)J.Immunol.,151:2623。在一些情况下,所述框架来源于丰度最高的人亚类,V_L6亚组I(V_L6I)和V_H亚组III(V_HIII)的共有序列。在另一种方法中,在框架区来源使用人种系基因。

[0223] 在称为超人源化的基于CDR比较的替代范式中,FR同源性是不相关的。所述方法包括非人序列与功能性人种系基因组库的比较。然后,选择编码它们的那些基因或者与鼠科序列密切相关的典型结构。然后,在与非人抗体共有典型结构的基因内,将在CDR内具有最高同源性的那些选择作为FR供体。最终,将非人CDR移植到这些FR上(参见,例如,Tan等人,J.Immunol.169:1119-1125,2002)。

[0224] 一般地,还期望将抗体人源化且保留它们对抗原的亲和力及其它良好的生物学性质。为了实现该目标,根据一种方法,通过亲代序列分析方法以及使用亲代和人源化序列的三维模型的多种概念性人源化产品,制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是通常可用的并且是本领域技术人员熟悉的。说明和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构的计算机程序是可用的。这些包括(例如)WAM(Whitelegg and Rees,Protein Eng.13:819-824,2000)、Modeller(Sali and Blundell,J.Mol.Biol.234:779-815,1993)和Swiss PDB Viewer(Guex and Peitsch,Electrophoresis 18:2714-2713,1997)。对这些展示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列中发挥功能的可能作用,例如,影响候选免疫球蛋

白结合其抗原的能力的残基的分析。以这种方式,可以从受体和输入序列选择FR残基并组合,从而实现所期望的抗体特征,如对靶标抗原提高的亲和力。通常,高变区残基直接并且最显著地参与影响抗原结合。

[0225] 另一种抗体人源化的方法基于被称为人类序列含量(HSC)的抗体人性的度量。这种方法将小鼠序列与人种系基因组库相比较并将差异作为HSC打分。然后,通过将其HSC最大化,而不是使用全局同一性量度来使靶标序列人源化以产生多种不同的人源化变体。(参见,例如,Lazar等人,Mol.Immunol.44:1986-1998,2007)。

[0226] 除以上所描述的方法外,经验方法可以用于产生和选择人源化抗体。这些方法包括基于大型人源化变体文库的产生和使用富集技术或高通量筛选技术的最佳克隆选择的那些方法。抗体变体可以分离自噬菌体、核糖体和酵母展示文库以及通过菌落筛选(参见,例如,Hoogenboom,Nat.Biotechnol.23:1105-1116,2005;Dufner等人,Trends Biotechnol.24:523-529,2006;Feldhaus等人,Nat.Biotechnol.21:163-70,2003;Schlapschy等人,Protein Eng.Des.Sel.17:847-60,2004)。

[0227] 在FR文库方法中,在FR中的特定位置引入一系列残基变体,然后选择文库以选择最佳支持移植的CDR的FR。要替换的残基可以包括鉴别为潜在有助于CDR结构的一些或全部“游标”残基(参见,例如,Foote and Winter,J.Mol.Biol.224:487-499,1992)或者来自Baca等人所鉴别的靶标残基的更有限的组(J.Biol.Chem.272:10678-10684,1997)。

[0228] 在FR重排中,将完整FR与非人CDR组合,而不是产生所选残基变体的组合文库(参见,例如,Dall′Acqua等人,Methods 36:43-60,2005)。可以在两步选择方法中对于结合筛选文库,所述方法的第一步是将VL人源化,然后是VH。作为另外一种选择,可以使用一步FR重排法。已表明该方法比两步筛选更有效,因为所得抗体显示出改善的生物化学和理化性质,包括增强的表达、提高的亲和力和热稳定性(参见,例如,Damschroder等人,Mol.Immunol.44:3049-60,2007)。

[0229] “人源改造(humaneering)”方法基于必需最小特异性决定簇(MSD)的实验识别并且基于非人片段向人FR文库的顺序替换和结合评价。它起始于非人VH和VL链的CDR3的区域并且将非人抗体的其它区域逐渐替换为人FR,包括VH和VL两者的CDR1和CDR2。这种方法通常导致表位保留和抗体从具有不同人V-节段CDR的多个亚类的鉴别。人源改造允许与人种系基因抗体91-96%同源的抗体的分离。(参见,例如,Alfenito,Cambridge Healthtech Institute's Third Annual PEGS,The Protein Engineering Summit,2007)。

[0230] “人工程化”方法包括通过对抗体氨基酸序列做出特异性改变以产生在人中免疫原性降低同时仍然保留了原始非人抗体所期望的结合性质的修饰抗体,改变非人抗体或抗体片段,如小鼠或者嵌合抗体或抗体片段。通常,该技术包括将非人(例如,小鼠)抗体的氨基酸残基分类为“低风险”、“中风险”或“高风险”残基。使用相对于替换将影响所得抗体折叠和/或用人残基替换的风险评价做出特定替换的预测益处(例如,对于在人中的免疫原性)的全局风险/奖励计算来进行分类。可以通过将来自非人抗体可变区的氨基酸序列与特定或共有人抗体序列的相应区域进行比对来选择要在非人(例如,小鼠)抗体序列的给定位置(例如,低或中风险)处替换的特定人氨基酸残基。根据比对,非人序列中低(“低”)或中(“中”)风险位置处的氨基酸残基可以被替换为人抗体序列中的相应残基。制备人工程化蛋白的技术更详细地描述于Studnicka等人,Protein Engineering,7:805-814(1994)、美国

专利5,766,886、5,770,196、5,821,123和5,869,619,和PCT专利申请公开WO 93/11794。

[0231] 本文提供了基于以上所提及的人工程学方法所产生的示例性人源化抗体,包括表示为A-1 5B08_LoW、A-1 5B08_Low+Mod、A2-7A05_Low、A2-7A05_Low+Mod、C-14D12_Low和C-14D12_Low+Mod的人源化抗体。图2C、2D、2E、2F、2G和2H中显示了根据这些人源化抗体的多种编号方案(例如,Kabat、AbM、Chothia、Contact和IMGT)的VH、VL和CDR序列。

[0232] 更具体地,表示为A-15B08_Low的抗体包含含有SEQ ID NO:136的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:137的氨基酸序列的VL。图2C和2D中显示了根据Kabat、AbM、Chothia、Contact和IMGT的A-15B08_Low的6个CDR序列。

[0233] 更具体地,表示为A-15B08_LoW+Mod的抗体包含含有SEQ ID NO:138的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:139的氨基酸序列的VL。图2C和2D中显示了根据Kabat、AbM、Chothia、Contact和IMGT的A-15B08_LoW+Mod的6个CDR序列。

[0234] 更具体地,表示为A2-7A05_Low的抗体包含含有SEQ ID NO:140的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:141的氨基酸序列的VL。图2E和2F中显示了根据Kabat、AbM、Chothia、Contact和IMGT的A2-7A05_Low的6个CDR序列。

[0235] 更具体地,表示为A2-7A05_Low+Mod的抗体包含含有SEQ ID NO:142的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:143的氨基酸序列的VL。图2E和2F中显示了根据Kabat、AbM、Chothia、Contact和IMGT的A2-7A05_Low+Mod的6个CDR序列。

[0236] 更具体地,表示为C-14D12_Low的抗体包含含有SEQ ID NO:144的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:145的氨基酸序列的VL。图2G和2H中显示了根据Kabat、AbM、Chothia、Contact和IMGT的C-14D12_Low的6个CDR序列。

[0237] 更具体地,表示为C-14D12_Low+Mod的抗体包含含有SEQ ID NO:146的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:147的氨基酸序列的VL。图2G和2H中显示了根据Kabat、AbM、Chothia、Contact和IMGT的C-14D12_Low+Mod的6个CDR序列。

[0238] 在一些实施方式中,本文提供了α5β1整合素结合剂(例如,结合α5β1整合素,例如,人α5β1整合素的抗体或其片段),其包含来自A-15B08_LoW、A-15B08_Low+Mod、A2-7A05_Low、A2-7A05_Low+Mod、C-14D12_Low和C-14D12_Low+Mod的一个或多个CDR序列,如图2C、2D、2E、2F、2G和2H所示。

[0239] 在一些实施方式中,本文所提供的α5β1整合素结合剂包含含有如包含SEQ ID NO:136所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3的VH。在一些实施方式中,本文所提供的α5β1整合素结合剂包含含有如包含SEQ ID NO:137所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的VL。在一些实施方式中,本文所提供的α5β1整合素结合剂包含含有如包含SEQ ID NO:136所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3的VH;和含有如包含SEQ ID NO:137所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的VL。在一些实施方式中,CDR根据Kabat编号。在一些实施方式中,CDR根据AbM编号。在一些实施方式中,CDR根据Chothia编号。在一些实施方式中,CDR根据Contact编号。在一些实施方式中,CDR根据IMGT。在一些实施方式中,CDR根据选自Kabat、AbM、Chothia、Contact和IMGT的两种或更多种编号方案的组合。

[0240] 在一些实施方式中,本文所提供的α5β1整合素结合剂包含含有如包含SEQ ID NO:138所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3的VH。在一些实施方式中,

本文所提供的α5β1整合素结合剂包含含有如包含SEQ ID NO:139所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的VL。在一些实施方式中,本文所提供的α5β1整合素结合剂包含含有如包含SEQ ID NO:138所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3的VH;和含有如包含SEQ ID NO:139所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的VL。在一些实施方式中,CDR根据Kabat编号。在一些实施方式中,CDR根据AbM编号。在一些实施方式中,CDR根据Chothia编号。在一些实施方式中,CDR根据Contact编号。在一些实施方式中,CDR根据IMGT。在一些实施方式中,CDR根据选自Kabat、AbM、Chothia、Contact和IMGT的两种或更多种编号方案的组合。

[0241] 在一些实施方式中,本文所提供的α5β1整合素结合剂包含含有如包含SEQ ID NO:140所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3的VH。在一些实施方式中,本文所提供的α5β1整合素结合剂包含含有如包含SEQ ID NO:141所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的VL。在一些实施方式中,本文所提供的α5β1整合素结合剂包含含有如包含SEQ ID NO:140所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3的VH;和含有如包含SEQ ID NO:141所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的VL。在一些实施方式中,CDR根据Kabat编号。在一些实施方式中,CDR根据AbM编号。在一些实施方式中,CDR根据Chothia编号。在一些实施方式中,CDR根据Contact编号。在一些实施方式中,CDR根据IMGT。在一些实施方式中,CDR根据选自Kabat、AbM、Chothia、Contact和IMGT的两种或更多种编号方案的组合。

[0242] 在一些实施方式中,本文所提供的α5β1整合素结合剂包含VH,所述VH含有如包含SEQ ID NO:142的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3。在一些实施方式中,本文所提供的α5β1整合素结合剂包含含有如包含SEQ ID NO:143所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的VL。在一些实施方式中,本文所提供的α5β1整合素结合剂包含含有如包含SEQ ID NO:142所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3的VH;和含有如包含SEQ ID NO:143所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的VL。在一些实施方式中,CDR根据Kabat编号。在一些实施方式中,CDR根据AbM编号。在一些实施方式中,CDR根据Chothia编号。在一些实施方式中,CDR根据Contact编号。在一些实施方式中,CDR根据IMGT。在一些实施方式中,CDR根据选自Kabat、AbM、Chothia、Contact和IMGT的两种或更多种编号方案的组合。

[0243] 在一些实施方式中,本文所提供的α5β1整合素结合剂包含含有如包含SEQ ID NO:144所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3的VH。在一些实施方式中,本文所提供的α5β1整合素结合剂包含含有如包含SEQ ID NO:145所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的VL。在一些实施方式中,本文所提供的α5β1整合素结合剂包含含有如包含SEQ ID NO:144所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3的VH;和含有如包含SEQ ID NO:145所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的VL。在一些实施方式中,CDR根据Kabat编号。在一些实施方式中,CDR根据AbM编号。在一些实施方式中,CDR根据Chothia编号。在一些实施方式中,CDR根据Contact编号。在一些实施方式中,CDR根据IMGT。在一些实施方式中,CDR根据选自Kabat、AbM、Chothia、Contact和IMGT的两种或更多种编号方案的组合。

[0244] 在一些实施方式中,本文所提供的α5β1整合素结合剂包含含有如包含SEQ ID NO:

146所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3的VH。在一些实施方式中,本文所提供的α5β1整合素结合剂包含含有如包含SEQ ID NO:147所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的VL。在一些实施方式中,本文所提供的α5β1整合素结合剂包含含有如包含SEQ ID NO:146所示的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3的VH;和含有如包含SEQ ID NO:147所示的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的VL。在一些实施方式中,CDR根据Kabat编号。在一些实施方式中,CDR根据AbM编号。在一些实施方式中,CDR根据Chothia编号。在一些实施方式中,CDR根据Contact编号。在一些实施方式中,CDR根据IMGT。在一些实施方式中,CDR根据选自Kabat、AbM、Chothia、Contact和IMGT的两种或更多种编号方案的组合。

[0245] 在一些实施方式中,本文所提供的抗体或其片段包含含有与SEQ ID NO:136具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列的VH,和与SEQ ID NO:137具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列的VL,并且维持了抗体或其片段与α5β1整合素(例如,人α5β1整合素)的结合(例如,基本维持,例如,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)。

[0246] 在一些实施方式中,本文所提供的抗体或其片段包含含有与SEQ ID NO:138具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列的VH,和与SEQ ID NO:139具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列的VL,并且维持了抗体或其片段与α5β1整合素(例如,人α5β1整合素)的结合(例如,基本维持,例如,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)。

[0247] 在一些实施方式中,本文所提供的抗体或其片段包含含有与SEQ ID NO:140具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列的VH,和与SEQ ID NO:141具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列的VL,并且维持了抗体或其片段与α5β1整合素(例如,人α5β1整合素)的结合(例如,基本维持,例如,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)。

[0248] 在一些实施方式中,本文所提供的抗体或其片段包含含有与SEQ ID NO:142具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列的VH,和与SEQ ID NO:143具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列的VL,并且维持了抗体或其片段与α5β1整合素(例如,人α5β1整合素)的结合(例如,基本维持,例如,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)。

[0249] 在一些实施方式中,本文所提供的抗体或其片段包含含有与SEQ ID NO:144具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列的VH,和与SEQ ID NO:145具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列的VL,并且维持了抗体或其片段与α5β1整合素(例如,人α5β1整合素)的结合(例如,基本维持,例如,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)。

[0250] 在一些实施方式中,本文所提供的抗体或其片段包含含有与SEQ ID NO:146具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列的VH,和与SEQ ID NO:147具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列的VL,并且维持了抗体或其片段与α5β1整合素(例如,人α5β1整合素)的结合(例如,基本维持,例如,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)。

[0251] 在一些实施方式中,本文所提供的抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:136所示的氨基酸序列的VH,和含有SEQ ID NO:137所示的氨基酸序列的VL。

[0252] 在一些实施方式中,本文所提供的抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:138所示的氨基酸序列的VH,和含有SEQ ID NO:139所示的氨基酸序列的VL。

[0253] 在一些实施方式中,本文所提供的抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:140所示的氨基酸序列的VH,和含有SEQ ID NO:141所示的氨基酸序列的VL。

[0254] 在一些实施方式中,本文所提供的抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:142所示的氨基酸序列的VH,和含有SEQ ID NO:143所示的氨基酸序列的VL。

[0255] 在一些实施方式中,本文所提供的抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:144所示的氨基酸序列的VH,和含有SEQ ID NO:145所示的氨基酸序列的VL。

[0256] 在一些实施方式中,本文所提供的抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:146所示的氨基酸序列的VH,和含有SEQ ID NO:147所示的氨基酸序列的VL。

[0257] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂包含非抗体蛋白质骨架。这种非抗体蛋白质骨架的非限制性实例包括纤连蛋白骨架、抗运载蛋白、纤连蛋白(adnectin)、亲和体(affibody)、DARPin、fynomer、affitin、affilin、高亲和性多聚体(avimer)、富含半胱氨酸的打结素(knottin)肽或者工程化Kunitz型抑制剂。产生这种非抗体蛋白质骨架的方法在本领域中是熟知的,其中任一种方法可以用于产生包含非抗体蛋白质骨架的α5β1整合素结合剂(参见,例如,Simeon and Chen,Protein Cell,9(1):3-14(2018);Yang等人,Annu Rev Anal Chem(Palo Alto Calif).10(1):293-320(2017))。

[0258] 还提供了用于产生α5β1整合素结合剂,包括人α5β1整合素结合剂及其片段的材料。例如,分离的细胞(例如,杂交瘤、转化或转染的细胞)可以产生α5β1整合素结合剂(例如,抗体或抗体片段)。就此而言,细胞(例如,分离的细胞)可以产生包含VH和VL的抗体或其片段,对于A-15B08、A2-3B06、A2-5D10、A2-7A05、A2-7F01或C-14D12AB1,所述VH和VL分别如表1、2、3、4、5或6所示,或者对于A-15B08-T62A、A-15B08_Low、A-15B08_Low+Mod、A2-7A05_Low、A2-7A05_Low+Mod、C-14D12_Low和C-14D12_Low+Mod如图2C-2H所示。在一些实施方式中,本文所描述的多核苷酸可以包含编码α5β1整合素结合剂(例如,抗体或抗体片段)的一种或多种核酸序列。在一些实施方式中,多核苷酸是分离和/或重组的多核苷酸。在多个方面,分离的多核苷酸包含编码抗体重链可变区(VH)和/或抗体轻链可变区(V_L)的核苷酸序列,其中V_H和V_L包含与如表1所示的CDR、如表2所示的CDR、如表3所示的CDR、如表4所示的CDR、如表5所示的CDR、如表6所示的CDR或如图2C-2H所示的CDR相同的CDR(根据Kabat和/或Chothia、AbM、Contact或IMGT)。

[0259] 在一些实施方式中,一个或多个载体(例如,表达载体)可以包含用于一个或多个多核苷酸在适合的宿主细胞中表达的一个或多个多核苷酸。这些载体(例如)对于在宿主细胞中扩增多核苷酸以产生其有用的量,和对于使用重组技术表达结合剂,例如,如抗体或抗体片段是有用的。

[0260] 在一些实施方式中,一个或多个载体是表达载体,其中编码抗体序列的一个或多个多核苷酸可操作性连接至一个或多个包含表达控制序列的多核苷酸。具体考虑了引入编码结合α5β1整合素的抗体序列的一个或多个多核苷酸的自主复制重组表达构建体,如质粒和病毒DNA载体。表达控制DNA序列包括启动子、增强子和操纵子,并且通常基于其中将使用

表达构建体(例如,表达载体)的表达系统选择。通常对于提高基因表达的能力选择启动子和增强子序列,而通常对于调控基因表达的能力选择操纵子序列。表达构建体(例如,表达载体)还可以包括编码允许鉴别具有所述构建体的宿主细胞的一个或多个可选择标志物的序列。表达构建体(例如,表达载体)还可以包括有助于,并且优选地促进宿主细胞中同源重组的序列。在一些实施方式中,表达构建体(例如,表达载体)还可以包括对于宿主细胞中的复制所必需的序列。

[0261] 示例性表达控制序列包括启动子/增强子序列,包括(例如)巨细胞病毒启动子/增强子(Lehner等人,J.Clin.Microbiol.,29:2494-2502,1991;Boshart等人,Cell,41:521-530,1985);劳氏肉瘤病毒启动子(Davis等人,Hum.Gene Ther.,4:151,1993);Tie启动子(Korhonen等人,Blood,86(5):1828-1835,1995);猿猴病毒40启动子;DRA(腺瘤中下调;Alrefai等人,Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.,293:G923-G934,2007);MCT1(单羧酸转运体1;Cuff等人,Am.J.Physiol.Gastrointet.Liver Physiol.,G977-G979.2005);和Math1(小鼠无调同源蛋白1;Shroyer等人,Gastroenterology,132:2477-2478,2007),为了在哺乳动物细胞中表达,将所述启动子可操作性连接至多肽编码序列上游(例如,5′)。在另一个变化中,所述启动子是上皮细胞-特异性启动子或内皮细胞-特异性启动子。多核苷酸还可以任选地包括多肽编码序列下游(例如,3′)可操作性连接的适合的多腺苷酸化序列(例如,SV40或人生长激素基因多腺苷酸化序列)。

[0262] 如果需要,所述一个或多个多核苷酸还任选地包含编码在框中与所述多肽序列融合的分泌性信号肽的核苷酸序列。所述分泌性信号肽指导通过表达一个或多个多核苷酸的细胞的抗体多肽的分泌并且被所述细胞从所述分泌的多肽上切割。所述一个或多个多核苷酸还可以任选地包含其仅有的预期功能将是辅助载体大规模生产的序列。可以使用已在文献中对于多种转基因描述的程序生产和施用用于基因疗法的多核苷酸。参见,例如,Isner等人,Circulation,91:2687-2692,1995;和Isner等人,Human GeneTherapy,7:989-1011,1996。

[0263] 在一些实施方式中,多核苷酸还可以包含其它序列以帮助通过宿主细胞的吸收和所述抗体或其片段(和/或任何其它肽)的表达。在一些实施方式中,使用本文所描述的编码抗体或其片段的“裸”转基因(例如,无病毒、脂质体或其它载体辅助转染的转基因)。

[0264] 任何适合的载体可以用于将编码抗体或其片段的一个或多个多核苷酸引入宿主中。已描述的示例性载体包括复制缺陷型反转录病毒载体,其包括(但不限于)慢病毒载体(参见,例如,Kim等人,J.Virol.,72(1):811-816,1998;Kingsman&Johnson,Scrip Magazine,October,1998,第43-46页);细小病毒载体,如腺-相关病毒(AAV)载体(美国专利No.5,474,9351;5,139,941;5,622,856;5,658,776;5,773,289;5,789,390;5,834,441;5,863,541;5,851,521;5,252,479;Gnatenko等人,J.Invest.Med.,45:87-98,1997);腺病毒(AV)载体(参见,例如,美国专利No.5,792,453;5,824,544;5,707,618;5,693,509;5,670,488;5,585,362;Quantin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:2581-2584,1992;Stratford Perricaudet等人,J.Clin.Invest.,90:626-630,1992;和Rosenfeld等人,Cell,68:143-155,1992);腺病毒腺-相关病毒嵌合载体(美国专利No.5,856,152)或牛痘病毒或疱疹病毒载体(美国专利No.5,879,934;5,849,571;5,830,727;5,661,033;5,328,688);lipofectin介导的基因转移(BRL);脂质体载体(美国专利No.5,631,237);及其组合。可以使用标准重

组DNA技术制备任何这些表达载体,所述技术描述于(例如)Sambrook等人,Molecular Cloning,a Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989)和Ausubel等人,CurrentProtocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates and John Wiley&Sons,New York,N.Y.(1994)。任选地,通过(例如)缺失或破坏病毒复制所需的选择基因,使病毒载体成为复制-缺陷型。

[0265] 其它所考虑的非病毒递送机制包括磷酸钙沉淀(Graham and Van Der Eb,Virology,52:456-467,1973;Chen and Okayama,Mol.Cell Biol.,7:2745-2752,1987;Rippe等人,Mol.Cell Biol.,10:689-695,1990)、DEAE-葡聚糖(Gopal,Mol.Cell Biol.,5:1188-1190,1985)、电穿孔(Tur-Kaspa等人,Mol.Cell Biol.,6:716-718,1986;Potter等人,Proc.Nat.Acad.Sci.USA,81:7161-7165,1984)、直接微注射(Harland and Weintraub,J.CellBiol.,101:1094-1099,1985)、加载DNA的脂质体(Nicolau and Sene,Biochim.Biophys.Acta,721:185-190,1982;Fraley等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,76:3348-3352,1979;Felgner,SciAm.,276(6):102-6,1997;Felgner,Hum GeneTher.,7(15):1791-3,1996)、细胞超声处理(Fechheimer等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84:8463-8467,1987)、使用高速微弹的基因轰击(Yang等人,Proc.Natl.Acad.Sci USA,87:9568-9572,1990)、和受体-介导的转染(Wu and Wu,J.Biol.Chem.,262:4429-4432,1987;Wu and Wu,Biochemistry,27:887-892,1988;Wu and Wu,Adv.Drug Delivery Rev.,12:159-167,1993)。

[0266] 可以将表达载体(或本文所描述的抗体或其片段)捕获在脂质体中。参见,例如,Ghosh and Bachhawat,In:Liver diseases.targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands,Wu G,Wu C主编,New York:Marcel Dekker,第87-104页(1991);Radler等人,Science,275(5301):810-814,1997)。还考虑了多种商品化方法,包括"脂质转染"技术。在一些实施方式中,脂质体可以与血凝病毒(HVJ)复合。这已显示辅助与细胞膜融合和促进脂质体-包封的DNA的细胞进入(参见,例如,Kaneda等人,Science,243:375-378,1989)。在一些实施方式中,脂质体与核非组蛋白性染色体蛋白质(HMG-1)复合或结合其一起使用(参见,例如,Kato等人,J.Biol.Chem.,266:3361-3364,1991)。在一些实施方式中,脂质体与HVJ和HMG-1两者复合或结合两者一起使用。这些表达构建体已成功用于核酸的体外和体内转移和表达。在一些实施方式中,在脂质体中包括α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂以将所述脂质体靶向在它们表面上表达α5β1整合素的细胞(如肿瘤细胞)。

[0267] 细胞可以包含一个或多个多核苷酸或一个或多个载体,例如,用编码α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂的一个或多个多核苷酸,或者包含所述一个或多个多核苷酸的一个或多个载体转化或转染所述细胞。在一些实施方式中,细胞表达并产生α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂,其含有一个或多个,包括6个与A-15B08的CDR具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、100%)同一性的CDR(参见,例如,表1)。在一些实施方式中,细胞表达并生产α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂,其含有包含与A2-3B06的那些相同的CDR的V_H和V_L(参见,例如,表2)。在一些实施方式中,细胞表达并生产α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂,其含有包含与A2-5D10的那些相同的CDR的V_H和V_L(参见,例如,表3)。在一些实施

方式中,细胞表达并生产α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂,其含有包含与A2-7A05的那些相同的CDR的V_H和V_L(参见,例如,表4)。在一些实施方式中,细胞表达并生产α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂,其含有包含与A2-7F01的那些相同的CDR的V_H和V_L(参见,例如,表5)。在一些实施方式中,细胞表达并生产α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂,其含有包含与C-14D12的那些相同的CDR的V_H和V_L(参见,例如,表6)。所述细胞可以是原核细胞,如大肠杆菌(Escherichia coli)(参见,例如,Pluckthun等人,Methods Enzymol.,178:497-515,1989)或者真核细胞,如动物细胞(例如,骨髓瘤细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或者杂交瘤细胞)、酵母(例如,酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae))或者植物细胞(例如,烟草、玉米、大豆或大米细胞)。哺乳动物宿主细胞的使用可以提供翻译修饰(例如,糖基化、截短、脂化和磷酸化),这些修饰对于赋予重组表达产物最优生物活性可以是期望的。类似地,可以使多肽(例如,α5β1整合素结合剂,如抗体),包括人α5β1整合素结合剂)糖基化或非糖基化和/或已将所述多肽共价修饰以包括一个或多个水溶性聚合物连接,如聚乙二醇、聚氧乙二醇或聚丙二醇。

[0268] 将DNA或RNA引入宿主细胞的方法是熟知的,并且包括转化、转染、电穿孔、核注射或与载体,如脂质体、胶束、血影细胞和原生质体融合。这些宿主细胞对于扩增多核苷酸以及表达所述多核苷酸所编码的多肽是有用的。在这方面,生产α5β1整合素结合剂(例如,抗体)的方法可以包含培养宿主细胞并分离α5β1整合素结合剂。可以使用粒子轰击实现裸DNA表达构建体向细胞的转移,其基于将DNA涂覆的微弹加速至高速的能力,从而允许它们刺穿细胞膜并进入细胞而不杀死它们(参见,例如,Klein等人,Nature,327:70-73,1987)。已开发了一些用于加速小颗粒的装置。一种这种装置依赖于高压放电以产生电流,其反过来提供动力(参见,例如,Yang等人,Proc.Natl.Acad Sci USA,87:9568-9572,1990)。所使用的微弹由生物学惰性物质,如钨或金珠组成。可以分离和/或纯化宿主细胞。宿主细胞还可以是体外转化以引起多肽体外瞬时或永久表达的细胞。宿主细胞还可以是离体转化并在转化后引入,例如,以体内产生用于治疗目的的多肽的分离的细胞。宿主细胞的定义明确排除了转基因人类。

[0269] 用于从多核苷酸产生抗体的多种方法通常是熟知的。例如,Maniatis等人,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory,New York,1 989(还参见Maniatis等人,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory,New York,2001)描述了基本分子生物学程序。另外,多种出版物描述了适合于通过DNA操纵、表达载体产生以及适合的细胞的转化和培养制备抗体的技术(参见,例如,Mountain and Adair,第1章,in Biotechnology and Genetic Engineering Reviews,Tombs主编,Intercept,Andover,UK,1992);和Current Protocols in Molecular Biology,Ausubel主编,Wiley Interscience,New York,1999)。

[0270] 使用任何适合的方法产生α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂,例如,从免疫动物分离,重组或合成产生或基因工程,包括如以上所描述的。通过(例如)抗体的蛋白水解获得来源于抗体的抗体片段。例如,完整抗体的木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化分别获得了被称为$F(ab')_2$的5S片段或者一价Fab片段和Fc片段。可以使用硫醇还原剂进一步切割$F(ab)_2$以产生3.5S Fab一价片段。以下文献中进一步描述了产生抗体片段的方法,例如,Edelman等人,Methods in Enzymology,1:422Academic Press(1967);Nisonoff

等人,Arch.Biochem.Biophys.,89:230-244,1960;Porter,Biochem.J.,73:119-127,1959;美国专利No.4,331,647;和Andrews,S.M.and Titus,J.A.inCurrent Protocols in Immunology(Coligan等人主编),John Wiley&Sons,New York(2003),第2.8.12.8.10和2.10A.12.10A.5页。

[0271] 可以将α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂基因工程。例如,α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂包含(例如)通过重组DNA工程技术产生的可变区或可变域。在这方面,任选地通过抗体氨基酸序列中的插入、缺失或改变修饰可变区以产生所关心的抗体,包括如以上所描述的。例如,使用抗体产生细胞的mRNA作为模板,通过使用聚合酶链反应合成可变区来制备编码所关心的互补决定区(CDR),包括如表1-6中所列的CDR的多核苷酸(参见,例如,Courtenay Luck,"Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies,"in Monoclona,Antibodie: Production,Engineering and Clinical Application,Ritter等人(主编),第166页(Cambridge University Press 1995);Ward等人,"Genetic Maniβulation and Expression ofAntibodies,"in Monoclonal Antibodies:Principles and Applications,Birch等人,(主编),第137页(Wiley Liss,Inc.1995);和Larrick等人,Methods:A Companion to Methods in Enzymology,2:106-110,1991)。当前的抗体操纵技术允许构建含有至少一个CDR和任选地来自第一抗体的一个或多个框架氨基酸和来自第二抗体的剩余的可变区结构域的工程化可变区结构域。使用这些技术(例如)使抗体人源化或改善其对于结合靶标的亲和力。

[0272] "人源化抗体"是其中非人免疫球蛋白的可变重链和轻链的CDR被转移至人可变域的抗体。在一些实施方式中,恒定区不需要存在,但是如果它们存在,则它们任选地与人免疫球蛋白恒定区基本相同,例如,至少约85-90%、约95%、96%、97%、98%、99%或以上相同。因此,在一些情况下,除可能地CDR之外,人源化免疫球蛋白的所有部分与天然人免疫球蛋白序列的相应部分基本相同。例如,人源化抗体是人免疫球蛋白(例如,宿主抗体),其中宿主抗体的高变区残基被来自非人物种(供体抗体),如小鼠、大鼠、兔或者具有所期望的特异性、亲和力和能力的非人灵长类动物的高变区残基替换。

[0273] 在一些实施方式中,本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)在治疗、预防或减轻α5β1整合素-介导的疾病、病症或病况,包括疾病、病症或病况的一种或多种症状的组合物和方法中有用。在一些实施方式中,将受试者诊断为α5β1整合素-介导的疾病、病症或病况。α5β1整合素-介导的疾病、病症和病况包括(但不限于)癌症(例如,与表达或过表达α5β1整合素的肿瘤细胞有关或以之为特征的癌症)、血管生成-介导的疾病(例如,与异常血管生成有关或以之为特征的疾病)和炎性疾病(例如,神经炎性疾病,包括MS和和ALS)。

[0274] 在一些实施方式中,本文描述了治疗受试者中癌症或肿瘤的方法,其包括向所述受试者施用本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)或其片段或者包含本文所描述的结合剂(例如,抗体)的药物组合物。在一些实施方式中,将受试者诊断为癌症。

[0275] 在一些实施方式中,本文描述了减轻受试者中与癌症或肿瘤相关的一种或多种症状的方法,其包括向所述受试者施用本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)或其片段或者包含本文所描述的结合剂(例如,抗体)的药物组合物。

[0276] 在一些实施方式中,本文描述了(i)治疗血管生成-介导的疾病、病症或病况或者(ii)抑制受试者(例如,患有肿瘤的受试者)中血管生成的方法,所述方法包括向所述受试

者施用本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)或其片段或者包含本文所描述的结合剂(例如,抗体)的药物组合物。在一些实施方式中,将受试者诊断为血管生成-介导的疾病、病症或病况。

[0277] 在一些实施方式中,本文描述了减轻受试者中与血管生成-介导的疾病、病症或病况有关的一种或多种症状的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)或其片段或者包含本文所描述的结合剂(例如,抗体)的药物组合物。

[0278] 在一些实施方式中,本文描述了治疗受试者中炎性疾病、病症或病况,包括神经炎性疾病、病症或病况(例如,MS、ALS)的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)或其片段或者包含本文所描述的结合剂(例如,抗体)的药物组合物。在一些实施方式中,将受试者诊断为炎性疾病、病症或病况,包括神经炎性疾病、病症或病况(例如,MS、ALS)。

[0279] 在一些实施方式中,本文描述了减轻受试者中与炎性疾病,包括神经炎性疾病、病症或病况(例如,MS、ALS)有关的一种或多种症状的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)或其片段或者包含本文所描述的结合剂(例如,抗体)的药物组合物。

[0280] 可以结合本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)或其片段或者包含本文所描述的结合剂(例如,抗体)的药物组合物向以上所描述的方法的受试者施用一种或多种本文所描述的治疗剂。

[0281] 在一些实施方式中,所述抗体是人抗体,其包括(但不限于)具有可变区的抗体,其中框架和CDR区两者来源于人种系免疫球蛋白序列,如(例如)Kabat等人(1991)Sequences of proteins of ImmunologicalInterest,第5版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH PublicationNo.91-3242。如果所述抗体含有恒定区,则所述恒定区还优选地来源于人种系免疫球蛋白序列。人抗体可以包含不被人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基,例如,以增强抗体活性,但是不包含来源于其它物种的CDR(例如,置于人可变框架区内的小鼠CDR)。

[0282] 在一些实施方式中,α5β1整合素结合剂(例如,抗体)结合至并杀死细胞培养物中的肿瘤细胞。这些细胞培养物可以包括表达或过表达α5β1整合素的肿瘤细胞。肿瘤细胞包括(但不限于)乳腺癌细胞、膀胱癌细胞、黑素瘤细胞、前列腺癌细胞、间皮瘤细胞、肺癌细胞、睾丸癌细胞、甲状腺癌细胞、鳞状细胞癌细胞、成胶质细胞瘤细胞、成神经细胞瘤细胞、子宫癌细胞、结肠直肠癌细胞、胃癌细胞、膀胱癌细胞和胰腺癌细胞。

[0283] 在一些实施方式中,本文描述了抑制受试者(例如,患有肿瘤的受试者)中异常血管生成的方法。例如,所述方法包括施用对于抑制异常血管生成有效的量的本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体),如人α5β1整合素结合剂。在一些实施方式中,所述方法包括施用与抗体A-15B08、抗体A2-3B06、抗体A2-5 D10、抗体A2-7A05、抗体A2-7F01和/或抗体C-14D12AB1(参见,例如,表1、2、3、4、5和/或6的CDR和VH/VL)竞争性地与人α5β1整合素结合和/或结合抗体A-15B08、抗体A2-3B06、抗体A2-5 D10、抗体A2-7A05、抗体A2-7F01和/或抗体C-14D12(参见,例如,表1、2、3、4、5和/或6的CDR和VH/VL)所识别的α5β1整合素区域,从而导致异常血管生成抑制的α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括α5β1整合素结合剂。在一些实施方式中,如以上所描述的一种或多种结合剂(例如,抗体)、多核苷酸、载体和/或细胞可

以用于抑制体内异常血管生成的方法(例如,治疗受试者中癌症的方法)。

[0284] 还提供了调节(例如,抑制、降低、防止)受试者中肿瘤生长的方法。例如,所述方法包括以对于调节受试者中肿瘤生长有效的量向所述受试者施用包含α5β1整合素结合剂(例如,抗体)的组合物。"肿瘤"是指任何赘生性细胞生长或增殖,无论是恶性还是良性的,并且是指所有癌前和癌性细胞和组织。术语"cancer"和"cancerous"表示或者描述所述生理条件中哺乳动物也就是说通常其特征为无限制的或者异常的细胞生长和包括都恶性的赘生物包括(但不限于):癌瘤,淋巴瘤,胚细胞瘤,肉瘤,并且白血病。癌症的实例包括(但不限于):乳腺癌(包括转移性乳腺癌)、宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌(包括转移性结肠直肠癌)、肺癌(包括非小细胞肺癌)、纤维肉瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、慢性淋巴细胞性白血病、膀胱癌、胰腺癌、肾细胞癌、脾脏癌、前列腺癌,包括激素难治性前列腺癌、肝癌、头颈癌、胃癌、膀胱癌、黑素瘤、卵巢癌、间皮瘤、软组织癌症、胃肠道间质瘤、多形性胶质母细胞瘤和多发性骨髓瘤。还提供了通过向对其有需要的受试者单独或与另一种试剂组合施用α5β1整合素结合剂(例如,抗体),如人α5β1整合素结合剂治疗、预防或改善癌症的方法。还提供了通过向对其有需要的受试者单独或与另一种试剂组合施用α5β1整合素结合剂(例如,抗体),如人α5β1整合素结合剂治疗、预防或改善癌症的一种或多种症状的方法。

[0285] "抑制"异常血管生成不需要100%抑制。考虑了降低肿瘤生长和/或转移的任何抑制。类似地,"调节"肿瘤生长是指降低肿瘤尺寸,减缓生长肿瘤或者抑制现有肿瘤的尺寸。不需要肿瘤完全消除;肿瘤尺寸的任何减少或者肿瘤生长的减缓构成了受试者中有益的生物作用。在这方面,与不存在所述方法的情况下所观察到的去除水平相比(例如,在未暴露于所述方法的试剂的生物学对比对照受试者或试样中),可以将肿瘤细胞去除增强(例如)至少约5%、至少约10%或者至少约20%。例如,通过肿瘤尺寸减小或肿瘤转移减少、肿瘤标志物水平降低或维持或者肿瘤细胞群体的减小或维持检测效果。在一些实施方式中,与不存在所述方法的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)的情况下的肿瘤细胞的去除相比,肿瘤细胞的去除增强了(例如)至少约30%,至少约40%,至少约50%,至少约60%,至少约70%,至少约80%,至少约90%或者以上(约100%)。

[0286] 特定受试者的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)的特定施用方案将部分取决于所使用的试剂、所施用的试剂的量、施用途径和任何副作用的原因和程度。向受试者(例如,哺乳动物,如人)施用的试剂(例如,抗体)的量应足以在合理的时间框内产生所期望的反应。因此,在一些实施方式中,向受试者施用的本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)或药物组合物的量是有效量。在一些实施方式中,向受试者施用的本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)或药物组合物的量是治疗有效量。在一些方面,所述方法包括施用(例如)约0.1μg/kg至多至约100mg/kg或以上。一些病况或疾病状态需要延长的治疗,其可以或可以不需要在多次使用中施用α5β1整合素结合剂(例如,抗体),包括人α5β1整合素结合剂(例如,抗体)的剂量。

[0287] 适合的包含α5β1整合素结合剂(例如,抗体),如人α5β1整合素结合剂(例如,抗体)的组合物的施用途径在本领域中是熟知的。尽管可以使用不止一种途径来施用试剂(例如,抗体),但是特定途径可以提供比另一种途径更快速且更有效的反应。根据情况,将包含α5β1整合素结合剂(例如,抗体),如人α5β1整合素结合剂的组合物应用或滴注至体腔中、通过皮肤或粘膜吸收、摄入、吸入和/或引入循环。例如,可以期望通过经由静脉内、皮下、腹膜

内、脑内(实质内)、脑室内、肌内、眼内、动脉内、门静脉内、病灶内、髓内、鞘内、心室内、透皮、皮下、腹膜内、鼻内、肠内、局部、舌下、尿道、阴道或直肠方式注射、通过缓释系统或者通过植入装置递送包含α5β1整合素结合剂(例如,抗体),如人α5β1整合素结合剂的组合物。如果需要,经由流向所关心的区域的动脉内或静脉内施用,例如,经由向肝脏递送的肝动脉,局部施用α5β1整合素结合剂(例如,抗体),如人α5β1整合素结合剂。作为另外一种选择,经由其上吸收或包封了所述结合剂的膜、海绵或另一种适合的材料的植入,局部施用α5β1整合素结合剂(例如,抗体),如人α5β1整合素结合剂。当使用植入装置时,在一个方面,将所述装置植入任何适合的组织或器官,并且α5β1整合素结合剂(例如,抗体),如人α5β1整合素结合剂的递送(例如)经由扩散、定时释放丸剂或连续施用。在其它方面,将α5β1整合素结合剂(例如,抗体)直接施用至肿瘤切除术或其它手术程序期间暴露的组织。

[0288] 本发明公开提供了组合物,如药物组合物,其包含α5β1整合素结合剂(例如,抗体),如人α5β1整合素结合剂,和载体(例如,药物可用的载体)。所使用的具体载体可以取决于化学-物理考虑,如溶解度和与结合剂缺少反应性或者共疗法以及通过施用途径。药物可用的载体是本领域中熟知的,本文描述了它们的实例。适合于注射使用的说明性药物形式包括无菌水溶液或分散系和用于无菌可注射溶液或分散系的即时制备的无菌粉末。注射制剂进一步描述于,例如,Pharmaceutics and Pharmacy Practice,J.B.Lippincott Co.,Philadelphia.Pa.,Banker and Chalmers.主编,第238-250页(1982)和ASHP Handbook on Injectable Drugs,Toissel,第4版,第622-630页(1986))。在一个方面,将包含α5β1整合素结合剂(例如,抗体),如人α5β1整合素结合剂的药物组合物与提供有关这些药物组合物的使用的说明的包装材料一起置于容器内。通常,这些说明包括描述对于所述药物组合物复原可能是必需的试剂浓度,并且在一些实施方式中,赋形剂成分或稀释剂(例如,水、盐水或PBS)的相对量的明确表达。

[0289] 在一些方面,本文所描述的方法还包括施用一种或多种其它试剂,包括治疗剂,其可以存在于组合物中或者可以与α5β1整合素结合剂(例如,抗体),如人α5β1整合素结合剂一起施用,或者提供于使用相同或不同施用途径的单独组合物中。可以与α5β1整合素结合剂(例如,抗体)一起(例如,用于组合疗法)或单独(例如,同时、交替、顺序)施用所述一种或多种其它试剂,包括治疗剂。这些其它治疗剂包括(但不限于)治疗抗体、免疫疗法和免疫治疗剂、细胞毒性剂、化疗剂和抑制剂。

[0290] 可以与如本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)一起使用(例如,用于组合疗法)的治疗性抗体包括(但不限于)αvβ3结合抗体(例如,埃达珠单抗(etaracizumab))、α4β1结合抗体(例如,那他珠单抗)、α4β7结合抗体(例如,维多珠单抗)、TREM2结合抗体(例如,AL002)、TNFα结合抗体(例如,阿达木单抗)、CSF1结合抗体(例如,MCS110)、CSF-1R结合抗体(例如,AMG820)、C1Q结合抗体(ANX005)、CD40L结合抗体(例如,卢利珠单抗)、FGFR抗体(例如,贝玛妥珠单抗(bemarituzumab))、IL-1β结合抗体(例如,卡那津单抗、吉伏组单抗(gevokizumab))、IL-6结合抗体(例如,托珠单抗)、IL-12结合抗体(例如,优特克单抗)和结合I型干扰素(IFN)的抗体(例如,西法木单抗(sifalimumab))。

[0291] 可以与如本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)一起使用(例如,用于组合疗法)的免疫疗法和免疫治疗剂包括(但不限于)细胞因子、白介素、肿瘤坏死因子及其组合。在一些实施方式中,所述免疫疗法包括调节免疫应答的免疫治疗剂,例如,检查点抑制

剂或检查点激动剂。在一些实施方式中,所述免疫治疗剂是本领域中已知的靶向下列的抗体调节剂:PD-1、PD-L1、PD-L2、CEACAM(例如,CEACAM-1、-3和/或-5)、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、TGF β、OX40、41BB、LIGHT、CD40、GITR、TGF-β、TIM-3、SIRP-α、VSIG8、BTLA、SIGLEC7、SIGLEC9、ICOS、B7H3、B7H4、FAS和/或BTNL2以及本领域中已知的其它靶点。在一些实施方式中,所述免疫治疗剂是提高自然杀伤(NK)细胞活性的试剂。在一些实施方式中,所述免疫治疗剂是抑制免疫应答抑制的试剂。在一些实施方式中,所述免疫治疗剂是抑制抑制性细胞或抑制性细胞活性的试剂。在一些实施方式中,所述免疫治疗剂是抑制Treg活性的试剂或疗法。在一些实施方式中,所述免疫治疗剂是抑制抑制性免疫检查点受体活性的试剂。

[0292] 在一些实施方式中,所述免疫治疗剂包括T细胞调节剂,其选自共刺激分子的激动剂或激活剂。在一个实施方式中,所述共刺激分子的激动剂选自GITR、OX40、ICOS、SLAM(例如,SLAMF7)、HVEM、LIGHT、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、CD30、CD40、BAFFR、CD7、NKG2C、NKp80、CD160、B7-H3或者CD83配体的激动剂(例如,激动性抗体或其抗原-结合片段,或者可溶性融合)。在其它实施方式中,效应细胞组合包括双重特异性T细胞接合剂(例如,结合至CD3和肿瘤抗原(例如,EGFR、PSCA、PSMA、EpCAM、HER2等)的双重特异性抗体分子)。

[0293] 可以与如本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)(例如,用于组合疗法)一起使用的细胞毒性剂包括抑制或防止细胞功能和/或导致细胞死亡或破坏的物质。示例性细胞毒性剂包括(但不限于)放射性同位素(例如,I^{131}、I^{125}、Y^{90}和Re^{186});化疗剂;和细菌、真菌、植物或动物来源的毒素,包括其片段和/或变体。

[0294] 可以与如本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)一起使用(例如,用于组合疗法)的化疗剂包括在癌症治疗中有用的化合物。化疗剂的实例包括,但不限于:烷化剂,如塞替派和CYTOXAN®环磷酰胺;烷基磺酸盐,如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶,如苯并多巴、卡波醌、米特多巴(meturedopa)和尤利多巴(uredopa);氮丙啶和甲基蜜胺,包括六甲蜜胺、曲他胺、三乙烯磷酰胺、三乙烯硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺(trimethylolomelamine);多聚乙酰(具体地,布拉他辛(bullatacin)和布拉它辛酮(bullatacinone));喜树碱(包括合成类似物拓扑替康);苔藓抑素;卡利斯汀(callystatin);CC-1065(包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物);念珠藻素(具体地念珠藻素1和念珠藻素8);尾海兔素;倍癌毒素(包括合成类似物、KW-2189和CB1-TM1);艾榴塞洛素;水鬼蕉碱(pancratistatin);匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑制素;氮芥类,如苯丁酸氮芥、萘氮芥、胆磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、盐酸氧氮芥、美法仑、新恩比星、胆甾醇对苯乙酸氮芥、泼尼莫司汀、曲磷胺、乌拉莫司汀;亚硝基脲,如卡莫司汀、吡葡亚硝脲、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀(ranimnustine);抗生素,如烯二炔抗生素(例如,卡里奇霉素(calicheamicin),具体地卡里奇霉素(calicheamicin)gamma1I和卡里奇霉素(calicheamicin)omegaI1(参见,例如,Agnew,ChemIntl.Ed.Engl.,33:183-186(1994));达内霉素(dynemicin)、包括达内霉素(dynemicin)A;二膦酸酯,如氯屈膦酸;埃斯培拉霉素(esperamicin);以及新制癌菌素发色团和相关色蛋白烯二炔抗生素发色团)、阿克拉霉素(aclacinomysin)、放线菌素、安曲霉素、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、卡柔比星(carabicin)、洋红霉素、嗜癌菌素、色霉素(chromomycinis)、更生霉素、柔

红霉素、地托比星、6-重氮基-5-氧-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN®多柔比星(包括吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉并-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素,如丝裂霉素C、麦考酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素(potfiromycin)、嘌罗霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链佐星、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗-代谢产物,如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙;嘌呤类似物,如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫唑嘌呤胺、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氮尿苷;雄激素,如卡普睾酮、屈他雄酮丙酸酯、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺,如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,如亚叶酸;醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶;安吖啶;贝斯布西(bestrabucil);比生群;依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);秋水仙胺;地吖醌;依氟鸟氨酸;依利醋铵;埃博霉素;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;蘑菇多糖;氯尼达明(lonidainine);美登素,如美登素和安丝菌素;米托胍腙、米托蒽醌、莫比达摩(mopidanmol)、二胺硝吖啶(nitraerine)、喷司他丁;蛋氨氮芥(phenamet)吡柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸;2-乙酰肼;丙卡巴肼;PSK®多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,Oreg);雷佐生;根霉素;西佐喃;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2′,2″-三氯三乙胺;单端孢霉烯(例如,T-2毒素、疣孢霉素A(verracurin A)、杆孢菌素A和蛇形菌素(anguidine));氨基甲酸乙酯;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;加西托星(gacytosine);阿糖胞苷(“Ara-C”);环磷酰胺;塞替派;类紫杉醇,例如,TAXOL®紫杉醇(Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.)、ABRAXANE™紫杉醇的无克列莫佛白蛋白工程化纳米颗粒制剂(American Pharmaceutical Partners,Schaumberg,Ill.)和TAXOTERE®多西他赛(Rhône-Poulenc Rorer,Antony,France);苯丁酸氮芥;GEMZAR®吉西他滨;6-硫代鸟嘌呤;巯嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物,如顺铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;NAVELBINE®长春瑞滨;诺凡特龙(novantrone);替尼泊苷;依达曲沙;道诺霉素;氨基蝶呤;希罗达;伊班膦酸;伊立替康(Camptosar,CPT-11)(包括伊立替康与5-FU和亚叶酸的治疗方案);局部异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类视黄醇,如视黄酸;卡培他滨;考布他丁;亚叶酸(LV);奥沙利铂,包括奥沙利铂治疗方案(FOLFOX);降低细胞增殖的PKC-α、Raf、H-Ras和EGFR的抑制剂(例如,厄洛替尼(Tarceva™))以及上述任一种的药物可用的盐、酸或衍生物。还包括起作用以调节或抑制对肿瘤的激素作用的抗激素剂,如抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂(SERM),包括(例如)他莫昔芬(包括NOLVADEX®他莫昔芬)、雷洛昔芬、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、雷洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮和FARESTON•托瑞米芬;抑制酶芳香酶的芳香酶抑制剂,其调节肾上腺中雌激素的产生,如(例如)4(5)-咪唑、氨鲁米特、MEGASE®甲地孕酮、AROMASIN®依西美坦、福美坦、法倔唑、RIVISOR®伏氯唑、FEMARA®来曲唑和ARIMIDEX®阿那曲唑;和抗雄激素,如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮脯利特和戈舍瑞林;以及曲沙他滨(1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物);反义寡核苷酸,具体地抑制涉及异常细胞增殖的信号转导通路中基因表达的那些,如(例如)PKC-α、Raf和H-Ras;核酶,如VEGF表达抑制剂(例如,ANGIOZYME®核酶)和HER2表达抑制剂;疫苗,如基因疗法疫苗,例如,ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗和VAXID®疫苗;PROLEUKIN®rIL-2;LURTOTECAN®拓扑异构酶1抑制剂;ABARELIX®rmRH;长春瑞滨和

埃斯培拉霉素(esperamicin)和以上任一种的药物可用的盐、酸或衍生物。

[0295] 可以与如本文所描述的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)一起使用(例如,用于组合疗法)的抑制剂包括(但不限于)激酶抑制剂,如FAK抑制剂(例如,GSK2256098)、MEK抑制剂(例如,考比替尼、曲美替尼、比美替尼、司美替尼)、酪氨酸激酶抑制剂(例如,卡博替尼);EGFR抑制剂(例如,厄洛替尼);Janus激酶(JAK)1-选择性抑制剂(例如,巴瑞克替尼、托法替尼、乌帕替尼)、CSF-1R抑制剂(例如,BLZ945);C-kit抑制剂(例如,马赛替尼);和FGFR抑制剂(例如,厄达替尼)。

[0296] 在一些实施方式中,如本文所公开的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)可以与PD-1的抑制剂或者PD-L1的抑制剂,例如,抗-PD-1单克隆抗体或者抗-PD-L1单克隆抗体,例如,纳武单抗(Opdivo)、派姆单抗(可瑞达(Keytruda)、MK-3475)、阿特珠单抗或阿维鲁单抗(Avelumab)组合使用。

[0297] 在一些实施方式中,如本文所公开的α5β1整合素结合剂(例如,抗体)可以与CTLA-4抑制剂,例如,抗-CTLA-4抗体,例如,普利木单抗(Yervoy)或者与细胞因子的抗体,或者与结合至PD-L1和CTLA-4或者PD-1和CTLA-4的双重特异性抗体,或者与其它抗癌剂组合使用。

[0298] 其它试剂可以是以上所描述的治疗剂中的任一种或其它试剂的药物可用的盐、酯、酰胺、水合物和/或前体药物。

[0299] 其它治疗剂可以是以上所描述的治疗剂中的任一种或其它试剂的药物可用的盐、酯、酰胺、水合物和/或前体药物。

[0300] 应理解在本文所描述的定义和主题内还提供了不显著影响本文所描述的多个实施方式的活动的改变。因此,以下实施例旨在说明,但不限制本发明的公开内容。

实施例

[0301] 实施例1:抗体产生和对于α5整合素结合的初始筛选

[0302] 对NZBW和CD-1小鼠(每种4只)注射100μg纯化的重组人α5β1整合素异源二聚体(rh-α5β1;Acro Biosystems,Newark,DE;产品目录号No.IT1-H52W5)。4周后,将来自脾脏和引流淋巴结的细胞融合以产生杂交瘤。通过流式细胞术,对于对已用10ng/mL PMA(佛波醇12-豆蔻酸酯13-乙酸盐;Sigma-Aldrich,St.Louis,MO;产品目录号No.5.00582)激活24小时的K562细胞(ATCC®CCL-243™;Manassas,VA 20110)呈阳性,筛选约4000个杂交瘤上清液(2,500个来自NZBW株,1,500个来自CD-1株),冷冻保存并在使用前立即融化。简言之,将杂交瘤上清液与激活的K562细胞培育20分钟,清洗,然后与荧光缀合的检测抗体培育20分钟,清洗,在7-氨基放线菌素D中再混悬,并且在Guava细胞计数器(Luminex Corporation,Austin,TX 78727)上测量平均荧光强度(MFI)。如表7所示,选择249个阳性克隆进行基于MFI显著高于(>1.5×)仅杂交瘤培养基(对K562细胞的MFI为125)的杂交瘤上清液的进一步筛选。

[0303] 表7

[0304]

抗体	MFI	抗体	MFI	抗体	MFI
A-2B04	1685	A-7H08	1924	A-14G05	3726
A-2E09	1629	A-8C06	2433	A-14G08	4207
A-2H03	373	A-8C07	2656	A-15B08	1388
A-3A08	1185	A-8E08	2444	A-15C03	1973
A-3B08	1621	A-8G02	2294	A-15D10	2342
A-3B12	1601	A-9A08	2647	A-15E11	1850
A-3C02	2081	A-9B08	2662	A-15H02	4046
A-3E08	895	A-9C03	2912	A-15H03	3577
A-3F10	2027	A-9E05	2419	A-15H11	6572
A-3G09	2241	A-9E06	2286	A2-10A11	2348
A-3H05	2084	A-9F09	1829	A2-10B05	1630
A-4D08	2192	A-9F10	348	A2-10B12	2791
A-4F09	2367	A-10B02	630	A2-10C10	2279
A-4G02	1977	A-10B04	1793	A2-10C11	2513
A-4H03	406	A-10F05	4140	A2-10E01	2400
A-5C03	593	A-10F08	2076	A2-10G01	2466
A-5D12	1642	A-10G02	2136	A2-10G06	2464
A-5F02	1839	A-11A10	2500	A2-1A05	1452
A-5G04	3474	A-11B02	2288	A2-1C04	1778
A-5H05	4210	A-11C01	2622	A2-1E01	1787
A-5H09	1797	A-11C08	2862	A2-1F09	1560
A-6A05	2607	A-11D06	921	A2-1G10	1654
A-6A12	2251	A-11E10	3009	A2-1H04	1805
A-6B09	366	A-11F06	5239	A2-1H07	1748
A-6C10	2267	A-11G01	1606	A2-1H09	1879
A-6D10	1030	A-11G03	1390	A2-2A06	1470
A-6E04	4763	A-11G06	4472	A2-2A07	2354
A-6E11	1662	A-11H02	3070	A2-2A11	1823
A-6H03	345	A-11H07	1890	A2-2B01	1927
A-7A10	685	A-12A11	3056	A2-2C11	1474
A-7B03	1882	A-12B06	2950	A2-2D03	1868
A-7C07	2355	A-12F09	368	A2-2D05	1781
A-7C09	2384	A-12H10	3929	A2-2E06	1317
A-7D04	1277	A-13A04	676	A2-2F05	1715
A-7D06	742	A-13A10	2684	A2-3B01	1873
A-7F05	3921	A-13F10	3296	A2-3B03	1920
A-7F06	2057	A-13H08	2638	A2-3B06	2136
A-7F09	2598	A-14B11	3367	A2-3B11	1575
A-7G10	1509	A-14C09	4703	A2-3D02	1243
A-7H02	2208	A-14F03	553	A2-3E04	1758

[0305]

抗体	MFI
A2-3E11	1265
A2-3G01	2069
A2-3G03	2230
A2-3G10	1910
A2-3H06	2138
A2-4B05	1885
A2-4B07	1695
A2-4D11	2005
A2-4E06	1169
A2-4E10	1799
A2-4G01	2256
A2-4H01	1908
A2-5A07	1528
A2-5B03	1928
A2-5B04	1102
A2-5B09	4143
A2-5C04	1982
A2-5D07	2055
A2-5D10	1890
A2-5F01	729
A2-5F02	2352
A2-5F10	1946
A2-5G04	2039
A2-5H05	1565
A2-5H11	2268
A2-6A07	969
A2-6A08	1548
A2-6A10	1289
A2-6C05	4281
A2-6C08	2375
A2-6C10	2121
A2-6E02	4173
A2-6F01	2481
A2-6G03	2200
A2-6H11	2272
A2-7A04	2248
A2-7A05	5503
A2-7E10	1950
A2-7F01	6255
A2-8B01	2300
A2-8B07	1102

抗体	MFI
A2-8C07	2594
A2-8D08	1896
A2-8D12	2779
A2-8E07	888
A2-8E09	2424
A2-8G08	2665
A2-8H06	2547
A2-8H11	4366
A2-9A03	990
A2-9A11	3395
A2-9B05	2169
A2-9C07	1972
A2-9C11	1096
A2-9D05	4685
A2-9D06	2028
A2-9F05	1987
A2-9F09	2290
A2-9G08	4093
A2-9G11	2327
A2-9H10	2471
C-1G03	1561
C-1H02	803
C-2F04	1243
C-2F10	687
C-2G03	2634
C-2H02	525
C-2H03	4654
C-3C11	415
C-3D02	4681
C-3F08	448
C-3H10	399
C-4A04	3047
C-4C02	388
C-4G03	519
C-4H08	471
C-5C04	447
C-5E04	2407
C-5F01	399
C-5G01	500
C-5G02	5121
C-5G03	371

抗体	MFI
C-5H03	2640
C-6B10	658
C-6C12	386
C-6F08	472
C-6G03	391
C-6H03	1719
C-6H07	418
C-7B08	6727
C-7B11	5609
C-8A09	714
C-8F09	475
C-8F11	4472
C-8G11	2693
C-8H03	2537
C-8H07	449
C-8H11	7289
C-9A06	334
C-9B01	3623
C-9C11	936
C-9E11	594
C-9G02	1717
C-9H03	1984
C-10A12	408
C-10F09	670
C-11C09	573
C-11E01	5272
C-11H03	1595
C-12A04	3479
C-12H05	1107
C-12H09	6609
C-13A11	355
C-13B02	629
C-13D04	7126
C-13E09	4379
C-13F01	5012
C-13H01	764
C-14D12	2015
C-14H03	1124
C-14H10	360
C-15B04	354
C-15C02	6294

[0306]

抗体	MFI
C-15C08	546
C-15E04	489
C-15F08	3987
C-15F10	365
C-15F11	5822
C-15H03	1177

[0307] 实施例2:对于α5结合特异性的筛选

[0308] 如实施例1所述,在板-基ELISA中对所选择的249个阳性杂交瘤上清液筛选对rh-α5β1的反应性。用1μg/mL在补充有0.5mM $MgCl_2$、$MnCl_2$和$CaCl_2$的PBS中的rh-α5β1(R&D Systems,Minneapolis,MN 55413,产品目录号No.3230-A5)涂覆Immulon4HBX ELISA 96-孔板(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,产品目录号No.3855)并在4℃培育过夜。用清洗缓冲液(含有0.05%Tween20的1×Tris缓冲盐水)将板清洗3次,用1×TBS中的2%BSA(由在TBS中的10×Thermo Scientific Blocker BSA(10×)制备;Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,产品目录号No.37520)在室温(RT)下封闭2小时,然后与用标准稀释剂(2%BSA,1×TBS,0.05%Tween20)稀释的杂交瘤上清液培育。在RT下培育1小时后,将孔清洗3次,与1:8000稀释的生物素化的山羊抗-小鼠第二抗体(Invitrogen,Carlsbad,CA,产品目录号No.62-6540)培育1小时,清洗3次,然后与聚HRP抗生蛋白链菌素(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,产品目录号No.N200)培育30分钟,清洗4次,与TMB(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,产品目录号No.N301)培育5-10分钟,随后添加ELISA终止溶液(Invitrogen,Carlsbad,CA,产品目录号No.SS04)。测量450nm的吸光值。结果如表8A和8B所示。

[0309] 表8A

[0310]

抗体	450nm 的吸光值			所选的人 α5 特异的
	人 α5β1	小鼠 α5β1	人 α4β1	
A-2B04	0.1084	0.2165	0.0974	否
A-2E09	0.1163	0.1417	0.1034	否
A-2H03	0.3487	0.2382	0.2448	否
A-3A08	0.3521	0.6708	0.0769	是
A-3B08	0.3792	0.0911	0.0767	否
A-3B12	0.441	0.0652	0.075	否
A-3C02	0.082	0.0632	0.0808	否
A-3E08	4	0.0852	2.5769	否
A-3F10	0.0903	0.0734	0.0775	否
A-3G09	0.1338	0.0879	0.1013	否
A-3H05	0.1382	0.1028	0.1045	否
A-4D08	0.1095	0.0848	0.0844	否
A-4F09	0.1227	0.0945	0.0914	否
A-4G02	0.6869	0.0959	0.0801	是
A-4H03	0.2637	0.1811	0.2028	否
A-5C03	0.0629	0.0539	0.0601	否
A-5D12	0.075	0.068	0.0797	否
A-5F02	0.13	0.1027	0.0994	否
A-5G04	0.172	0.0667	0.0757	否
A-5H05	0.3463	0.1424	0.1587	否
A-5H09	0.0818	0.0646	0.0789	否
A-6A05	0.6434	0.109	0.1038	否
A-6A12	0.1472	0.1202	0.1103	否
A-6B09	0.8353	0.5175	0.5583	否
A-6C10	0.4028	0.0969	0.0858	否
A-6D10	0.306	0.0791	0.0859	否
A-6E04	0.7985	0.3352	0.3234	否
A-6E11	1.0874	0.1883	0.1816	是
A-6H03	0.1106	0.0935	0.0885	否
A-7A10	0.1075	0.0747	0.0864	否
A-7B03	0.2604	0.1575	0.1568	否
A-7C07	0.106	0.0836	0.0867	否
A-7C09	0.8062	0.1092	0.1198	否
A-7D04	3.9383	0.0676	2.5841	否
A-7D06	0.613	0.0755	0.0848	是
A-7F05	0.344	0.0634	0.0835	否

[0311]

抗体	450nm 的吸光值			所选的人 α5 特异的
	人 α5β1	小鼠 α5β1	人 α4β1	
A-7F06	0.1247	0.0868	0.0943	否
A-7F09	0.3208	0.0922	0.1038	否
A-7G10	0.2368	0.0704	0.0757	否
A-7H02	0.0873	0.0679	0.0711	否
A-7H08	0.0707	0.0795	0.0632	否
A-8C06	0.1241	0.0827	0.088	否
A-8C07	0.3763	0.085	0.079	否
A-8E08	0.1166	0.089	0.088	否
A-8G02	0.1299	0.0926	0.0946	否
A-9A08	0.0898	0.0718	0.0753	否
A-9B08	0.7456	0.0999	0.0944	否
A-9C03	0.129	0.0859	0.1017	否
A-9E05	0.1206	0.0853	0.0754	否
A-9E06	0.0691	0.0608	0.0623	否
A-9F09	0.0579	0.0642	0.0637	否
A-9F10	0.0649	0.0536	0.0652	否
A-10B02	0.5028	0.2765	0.2848	否
A-10B04	0.5087	0.1134	0.1122	否
A-10F05	0.6922	0.2621	0.26	是
A-10F08	0.0761	0.0939	0.0792	否
A-10G02	0.1068	0.0863	0.0809	否
A-11A10	0.1154	0.0935	0.0858	否
A-11B02	0.0846	0.0693	0.1524	否
A-11C01	0.0851	0.0712	0.0685	否
A-11C08	0.3658	0.096	0.097	否
A-11D06	0.6792	0.1354	0.1377	是
A-11E10	0.1307	0.0863	0.1018	否
A-11F06	0.2314	0.0799	0.0905	否
A-11G01	0.5191	0.0766	0.0843	是
A-11G03	4	0.1105	2.644	否
A-11G06	0.7794	0.0659	0.0643	否
A-11H02	1.1794	0.2536	0.2508	否
A-11H07	0.5646	0.2788	1.6954	否
A-12A11	0.1206	0.0915	0.0882	否
A-12B06	0.1374	0.1035	0.1058	否
A-12F09	0.1329	0.0682	0.0745	否
A-12H10	0.725	0.0814	0.0972	是

[0312]

抗体	450nm 的吸光值			所选的人 α5 特异的
	人 α5β1	小鼠 α5β1	人 α4β1	
A-13A04	0.2271	0.0961	1.5607	否
A-13A10	1.0457	0.1158	0.1057	是
A-13F10	0.1028	0.0805	0.083	否
A-13H08	0.0712	0.0706	0.0676	否
A-14B11	0.0855	0.0827	0.0857	否
A-14C09	0.2857	0.0665	0.0683	否
A-14F03	0.065	0.0696	0.0721	否
A-14G05	0.1379	0.0944	0.1161	否
A-14G08	1.1672	0.1101	0.1082	是
A-15B08	0.8241	0.0924	0.0855	是
A-15C03	0.4782	0.0709	0.0793	是
A-15D10	4	0.0647	2.5858	否
A-15E11	0.384	0.0594	0.0946	否
A-15H02	0.952	0.1077	0.1149	否
A-15H03	1.4724	0.2658	0.2527	否
A-15H11	1.2506	0.0799	0.081	是
C-1G03	0.0681	0.0479	0.073	否
C-1H02	0.2343	0.1417	0.1873	否
C-2F04	0.288	0.089	0.0937	否
C-2F10	0.1306	1.2717	1.4726	否
C-2G03	0.1596	0.0794	0.1668	否
C-2H02	0.0769	0.0525	0.0666	否
C-2H03	2.7936	1.9471	2.5027	否
C-3C11	2.8486	0.0836	2.4763	否
C-3D02	0.5177	0.3261	0.3997	否
C-3F08	2.495	0.0598	2.7046	否
C-3H10	1.587	0.0594	2.1689	否
C-4A04	1.8716	0.1389	0.121	是
C-4C02	2.8954	0.1083	2.3639	否
C-4G03	0.2835	0.2123	0.2072	否
C-4H08	2.9081	0.0939	2.7376	否
C-5C04	3.168	0.2312	2.6409	否
C-5E04	0.1665	0.0835	0.0941	否
C-5F01	1.5882	0.4283	0.4783	否
C-5G01	2.7418	0.0865	2.2995	否
C-5G02	0.653	0.3808	0.3941	否
C-5G03	0.7942	0.573	0.5658	否

[0313]

抗体	450nm 的吸光值			所选的人 α5 特异的
	人 α5β1	小鼠 α5β1	人 α4β1	
C-5H03	0.068	0.059	0.1312	否
C-6B10	3.1915	0.1824	2.3102	否
C-6C12	2.8865	0.1219	2.187	否
C-6F08	3.1197	0.1017	2.6153	否
C-6G03	0.0633	0.0507	0.0727	否
C-6H03	0.0604	0.0559	0.0791	否
C-6H07	1.224	0.0743	0.0942	否
C-7B08	0.3579	0.2375	0.2159	是
C-7B11	0.5058	0.3476	0.34	否
C-8A09	0.772	0.0618	0.0857	否
C-8F09	2.6852	0.1054	2.4293	否
C-8F11	0.2259	0.0648	0.087	否
C-8G11	0.8047	0.0872	0.1645	是
C-8H03	0.0823	0.0798	0.1158	否
C-8H07	0.9156	0.0772	0.0882	否
C-8H11	1.0302	0.4727	0.4897	是
C-9A06	0.0912	2.3936	2.6409	否
C-9B01	0.1404	0.1146	0.1017	否
C-9C11	0.1389	0.1578	0.1478	否
C-9E11	2.823	0.1228	2.3282	否
C-9G02	0.1484	0.1135	0.077	否
C-9H03	0.0769	0.0947	0.073	否
C-10A12	2.5345	0.1411	2.3139	否
C-10F09	1.9713	0.1087	0.0803	是
C-11C09	0.9653	0.1033	0.0883	否
C-11E01	0.2311	0.1651	0.146	否
C-11H03	0.072	0.0922	0.0613	否
C-12A04	0.1	0.1018	0.1352	否
C-12H05	2.9323	0.1314	2.3868	否
C-12H09	0.3533	0.2619	0.2516	否
C-13A11	1.0918	0.1344	0.1019	否
C-13B02	2.701	0.1381	2.2382	否
C-13D04	0.6535	0.5035	0.4125	否
C-13E09	0.2133	0.14	0.1134	否
C-13F01	0.4665	0.3354	0.3691	否
C-13H01	0.3363	0.1236	2.119	否
C-14D12	0.702	0.1699	0.1707	是

[0314]

抗体	450nm 的吸光值			所选的人 α5 特异的
	人 α5β1	小鼠 α5β1	人 α4β1	
C-14H03	0.0653	0.0973	0.0713	否
C-14H10	2.0178	0.1617	0.1417	否
C-15B04	2.4029	0.1089	2.4022	否
C-15C02	1.0536	0.7504	0.8032	是
C-15C08	3.0525	0.1459	2.3658	否
C-15E04	2.8959	0.1376	2.3174	否
C-15F08	0.0688	0.0969	0.0939	否
C-15F10	0.1581	0.1178	0.0787	否
C-15F11	0.068	0.0947	0.071	否
C-15H03	0.0822	0.1094	0.0916	否

[0315] 表8B

[0316]

抗体	450nm 的吸光值			所选的人 α5 特异的
	人 α5β1	小鼠 α5β1	人 α4β1	
A2-1A05	0.3128	0.0652	0.0645	否
A2-1C04	0.2881	0.0563	0.0605	否
A2-1E01	0.3006	0.0575	0.0632	否
A2-1F09	0.2492	0.0493	0.0575	否
A2-1G10	0.2958	0.0525	0.0598	否
A2-1H04	0.3068	0.055	0.0591	否
A2-1H07	0.326	0.0518	0.0563	否
A2-1H09	0.3069	0.0514	0.0575	否
A2-2A06	0.3083	0.0522	0.057	否
A2-2A07	2.0978	0.0499	0.0592	否
A2-2A11	0.2576	0.0575	0.0612	否
A2-2B01	0.0954	0.0511	0.0563	否
A2-2C11	0.2295	0.055	0.0594	否
A2-2D03	0.269	0.0588	0.0651	否
A2-2D05	0.2356	0.0527	0.0619	否
A2-2E06	0.3011	0.0551	0.0656	否
A2-2F05	0.2787	0.0533	0.0615	否
A2-3B01	0.3051	0.0581	0.0615	否
A2-3B03	0.3221	0.0534	0.0598	否
A2-3B06	2.0288	0.049	0.0558	是
A2-3B11	0.2829	0.0551	0.0613	否
A2-3D02	0.2303	0.0529	0.0594	否
A2-3E04	0.239	0.0522	0.0576	否
A2-3E11	0.2059	0.0531	0.0566	否
A2-3G01	0.2653	0.0573	0.0649	否
A2-3G03	0.2784	0.0566	0.0648	否
A2-3G10	0.291	0.0533	0.0646	否
A2-3H06	0.2919	0.0551	0.0613	否
A2-4B05	0.3177	0.0546	0.0665	否
A2-4B07	0.3282	0.0601	0.0631	否
A2-4D11	0.2957	0.0545	0.0628	否
A2-4E06	2.0963	0.05	0.0563	否
A2-4E10	0.2842	0.0538	0.0636	否
A2-4G01	2.0015	0.091	0.0852	否
A2-4H01	0.1636	0.0521	0.0601	否
A2-5A07	1.5964	0.1552	0.123	否

[0317]

抗体	450nm 的吸光值			所选的人 α5 特异的
A2-5B03	0.2409	0.0563	0.0639	否
A2-5B04	0.1644	0.0517	0.0621	否
A2-5B09	1.8497	0.0612	0.0676	否
A2-5C04	0.326	0.0568	0.0635	否
A2-5D07	0.3061	0.0551	0.062	否
A2-5D10	2.3107	0.0647	0.0683	是
A2-5F01	0.5058	0.0505	0.057	否
A2-5F02	0.3518	0.0583	0.063	否
A2-5F10	0.2895	0.0538	0.06	否
A2-5G04	0.3432	0.059	0.0654	否
A2-5H05	1.4644	0.06	0.0642	否
A2-5H11	0.1404	0.0581	0.0636	否
A2-6A07	0.1111	0.0538	0.0601	否
A2-6A08	0.3056	0.06	0.0664	否
A2-6A10	0.1633	0.0526	0.0614	否
A2-6C05	1.8893	0.0863	0.0825	否
A2-6C08	0.3231	0.0576	0.0636	否
A2-6C10	2.0145	0.0551	0.0609	是
A2-6E02	1.7497	0.0535	0.0592	否
A2-6F01	0.3692	0.0566	0.064	否
A2-6G03	0.3429	0.066	0.0678	否
A2-6H11	0.3617	0.0549	0.0609	否
A2-7A04	0.3179	0.0549	0.0595	否
A2-7A05	2.0454	0.0682	0.0713	是
A2-7E10	0.2291	0.0634	0.0666	否
A2-7F01	2.0314	0.0563	0.0617	是
A2-8B01	0.3258	0.0659	0.07	否
A2-8B07	1.9484	0.0649	2.2718	否
A2-8C07	0.2728	0.0545	0.0613	否
A2-8D08	0.2894	0.0611	0.067	否
A2-8D12	0.2973	0.0549	0.0631	否
A2-8E07	0.3154	0.0588	0.0631	否
A2-8E09	0.2372	0.0524	0.06	否
A2-8G08	0.305	0.0568	0.0628	否
A2-8H06	0.2819	0.0567	0.0628	否
A2-8H11	1.4458	0.0515	0.0595	是
A2-9A03	0.0962	0.0577	0.0613	否
A2-9A11	1.9121	0.0619	0.0608	是

[0318]

抗体	450nm 的吸光值			所选的人 α5 特异的
A2-9B05	0.2211	0.0566	0.0672	否
A2-9C07	0.2783	0.0577	0.0656	否
A2-9C11	2.3712	0.0638	0.0679	否
A2-9D05	2.2156	0.0758	0.0686	否
A2-9D06	0.3405	0.0605	0.0632	否
A2-9F05	0.2276	0.0571	0.0594	否
A2-9F09	1.8866	0.0758	0.0705	否
A2-9G08	1.9022	0.0508	0.0586	否
A2-9G11	0.2839	0.0546	0.0624	否
A2-9H10	0.1615	0.0537	0.0682	否
A2-10A11	0.1696	0.0619	0.0648	否
A2-10B05	0.13	0.0596	0.0641	否
A2-10B12	0.232	0.059	0.0654	否
A2-10C10	0.2857	0.0606	0.0656	否
A2-10C11	0.2625	0.0568	0.0618	否
A2-10E01	0.2733	0.0562	0.0618	否
A2-10G01	0.2942	0.0634	0.0637	否
A2-10G06	0.3191	0.0576	0.064	是

[0319] 同时,通过测试对rh-α4β1(R&D Systems,Minneapolis,MN 55413;产品目录号No.3230-A5&5668-A4)的反应性,筛选249个杂交瘤对人α5亚基的特异性。结果如表8A和8B所示。对rh-α4β1和rh-α5β1两者起反应的任何杂交瘤可能是β1亚基特异的并且不认为是α5特异的。使用以上所描述的规程,29个杂交瘤上清液与rh-α4β1强烈反应(450nm的吸光值＞1.0)并且不认为是α5特异的。

[0320] 另外,除了板涂覆有rm-α5β1外,使用如上相同规程,测试杂交瘤对重组小鼠α5β1(rm-α5β1;R&D Systems,Minneapolis,MN 55413;产品目录号No.7728-A5)的交叉反应性。结果如表8A和8B所示。3个杂交瘤显示出对rm-α5β1的强结合(450nm的吸光值＞1.0),并且对rh-α4β1具有强反应性。

[0321] 在对α5亚基显示具有特异性结合的220个杂交瘤中,选择28个进行进一步鉴定并且它们代表了对rh-α4β1无交叉反应性的450nm的吸光值读数在0.32至2.3的范围内的一系列抗-α5结合抗体。在该1:10稀释的单点测定中,对rm-α5β1均无可检测的交叉反应性。

[0322] 实施例3:具有高α5结合亲和力的抗体的选择

[0323] 使用ForteBio Octet BMIA仪(ForteBio,Fremont,CA),对如实施例2所述,所选择的28个杂交瘤上清液进行动力学分析以计算结合至20nM rh-α5β1(Acro Biosystems,Newark,DE;产品目录号No.IT1-H52W5)的抗体克隆的平衡解离常数($K_D = k_{off/kon}$)。将抗-小鼠IgG Fc生物传感器用于加载每种克隆上清液。测定步骤如下所示:传感器检查(30s)--＞加载Ab(700s)--＞淬灭(480s)--＞基线(480s)--＞Ab结合(600s)--＞解离(600s)。表9显示了动力学数据。20个杂交瘤具有小于10纳摩尔(nM)的K_D,其范围在0.4至7.8nM,并选择用

于进一步鉴定。

[0324] 表9

抗体	K_D	k_{on}	k_{off}	所选的
A-3A08	5.08E-09	2.44E+05	1.24E-03	是
A-4G02	1.23E-09	3.21E+05	3.96E-04	是
A-6E11	3.22E-07	1.80E+05	5.80E-02	否
A-7D06	4.75E-09	2.70E+05	1.28E-03	是
A-10F05	7.84E-09	3.87E+05	3.03E-03	是
A-11D06	3.29E-08	9.56E+05	3.14E-02	否
A-11G01	5.03E-09	2.61E+05	1.32E-03	是
A-12H10	3.83E-08	1.21E+06	4.64E-02	否
A-13A10	4.19E-08	1.74E+06	7.27E-02	否
A-14G08	8.45E-10	2.34E+05	1.98E-04	是
A-15B08	1.31E-09	3.28E+05	4.31E-04	是
A-15C03	4.67E-09	2.76E+05	1.29E-03	是
A-15H11	9.01E-10	2.15E+05	1.93E-04	是
A2-10G06	5.85E-07	2.91E+05	1.70E-01	否
A2-3B06	4.74E-09	2.89E+05	1.37E-03	是
A2-5D10	2.32E-09	6.93E+05	1.61E-03	是
A2-6C10	3.50E-09	2.60E+05	9.11E-04	是
A2-7A05	8.00E-10	2.22E+05	1.78E-04	是
A2-7F01	1.30E-09	2.42E+05	3.14E-04	是
A2-8H11	4.81E-09	2.89E+05	1.39E-03	是
A2-9A11	5.02E-09	2.77E+05	1.39E-03	是
C-4A04	2.44E-09	1.12E+05	2.74E-04	是
C-7B08	4.90E-08	4.01E+05	1.97E-02	否
C-8G11	4.42E-10	2.71E+05	1.20E-04	是
C-8H11	1.07E-07	2.01E+05	2.14E-02	否
C-10F09	2.40E-09	3.00E+05	7.20E-04	是
C-14D12	3.79E-10	2.63E+05	9.94E-05	是
C-15C02	7.31E-07	3.34E+04	2.44E-02	否

[0325]

[0326] 实施例4:可变区测序以识别独特的抗体序列

[0327] 实施了如实施例3所述所选的20个克隆的重链和轻链可变区的DNA测序。从杂交瘤细胞小粒分离DNA并使用Sanger法测序。序列比对显示出9个独特的序列重链和轻链对,对其分配组号1至9。选择1个抗体克隆以表示如表10所示的每个独特的序列组。

[0328] 表10

[0329]

抗体	序列组	可变区序列	所选的独特的mAb
A-3A08	8	H+L	-
A-4G02	3	H+L	-
A-7D06	8	H+L	-
A-10F05	9	H+L	+
A-11G01	8	H+L	-
A-14G08	2	H+L	-
A-15B08	3	H+L	+
A-15C03	8	H	-
A-15H11	2	H+L	-
A2-3B06	8	H+L	+
A2-5D10	5	H+L	+
A2-6C10	8	H+L	-
A2-7A05	2	H+L	+
A2-7F01	4	H+L	+
A2-8H11	8	H+L	-
A2-9A11	8	H+L	-
C-4A04	7	H+L	+
C-8G11	1	H+L	-
C-10F09	6	H+L	+
C-14D12	1	H+L	+

[0330] 实施例5:抑制纤连蛋白与α5β1结合的抗体的选择

[0331] 为了确定如实施例4所述,所选的9个独特的杂交瘤克隆是否能够抑制α5β1整合素与纤连蛋白(FN)的结合,首先通过蛋白A色谱法从杂交瘤上清液纯化抗体,通过BCA测定(Pierce™ BCA蛋白质测定试剂盒;Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,产品目录号No.23225)测量蛋白浓度,然后以ELISA形式在定量FN抑制测定中测试。

[0332] 通过在4℃与2.5μg/mL人FN(R&D Systems,Minneapolis,MN 55413,产品目录号No.1918-FN)在1×PBS(0.01M磷酸盐缓冲液和0.154M NaCl,pH 7.4)培育过夜,用FN涂覆Immulon4 HBX ELISA 96-孔板。然后,用清洗缓冲液(含有0.05%Tween20的1×Tris缓冲盐水)清洗板3次,用在1×TBS中的2%BSA在室温(RT)下封闭2小时。在含有0.1μg/mL rh-α5β1-加6×His标签的蛋白(Acro Biosystems,Newark,DE,产品目录号No.IT1-H52W5)的标准稀释剂(2%BSA,1×TBS 0.05%Tween20)中稀释抗体,以产生在10,000ng/mL至0.17ng/mL的范围内的11点1:3抗体稀释系列。将同种型对照抗体(Control Ab;Ms IgG2a EMD Millipore Corp,Billerica,MA,产品目录号No.PP102)用于将不同测定运行间的数据进行归一化。对于测定,在除去封闭溶液并将孔清洗3次后,将100uL抗体稀释系列/加His-标签的-α5β1混合物加入至孔中。在RT下1小时后,清洗孔3次,与以1:1000处于标准稀释剂中的生物素化的抗-6×His-标签Ab(Invitrogen,Carlsbad,CA,产品目录号No.MAI-21315-BTIN)一起培育1小时,清洗3次,与聚HRP抗生蛋白链菌素(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,产品目录号No.N200)培育30分钟,清洗4次,与TMB底物(Thermo Fisher

Scientific,Waltham,MA,产品目录号No.N301)培育2-5分钟,随后添加ELISA终止溶液(Invitrogen,Carlsbad,CA,产品目录号No.SS04)。测量450nm的吸光值。将数据点对每个浓度的同种型对照Ab的值进行归一化并报告为归一化至对照Ab的450nm的吸光值的%。使用GraphPad Prism 9.0.2版(GraphPad Software,LLC,San Diego,CA),将非线性回归分析用于将曲线(4-参数)拟合至数据。图1和表11中显示了结果。

[0333] 表11

[0334]

抗体	IC50	最大抑制%
A-10F05	N/A	N/A
A-15B08	0.0033	96
A2-3B06	0.0130	93
A2-5D10	0.1475	93
A2-7A05	0.0271	41
A2-7F01	0.0215	60
C-4A04	N/A	N/A
C-10F09	N/A	N/A
C-14D12	0.0028	96
对照Ab	N/A	0

[0335] 如通过它们强烈抑制α5β1与FN的结合(≥93%最大抑制),部分抑制与FN的结合(≤60%最大抑制)或不抑制FN-结合的能力所定义的,鉴别了3类抗体(表11)。选择强烈或部分抑制α5β1与FN的结合的6种抗体用于进一步鉴定。

[0336] 实施例6:识别表位结合组的竞争结合研究

[0337] 使用生物膜干涉测量法(BLI),对如实施例5所述,所选择的6种抗体进行经由竞争结合研究的表位分析。将抗-α5β1 FN封闭抗体A2-7A05、C-14D12和A-15B08固定化在传感器上并与已与rh-α5β1预培育的其它抗体中的每一种培育,以确定该抗体-抗原结合是否防止或允许与传感器上抗体的结合。将所观察到的结合(响应)幅度与在相同条件下单独抗原的结合相比较。如果总响应大于单独抗原结合的120%,则抗体可以互相配对。如果响应小于单独抗原结合响应的80%,则抗体彼此阻断。规程如下所示:将抗体组与抗原预培育(1hr)。平衡传感器(30秒(s))--＞将先导Ab加载到传感器上(700s)---＞淬灭(480s)---＞读取基线(480s)---＞测量预培育的Ab+Ag与加载的传感器的结合(600s)。结果如表12A和12B所示。

[0338] 例如,与A2-7A05或A2-7F01复合的rh-α5β1能够结合传感器上的C-14D12和A-15B08。与A-15B08、A2-3B06、A2-5D10或C-14D12复合的rh-α5β1能够结合至传感器上的A2-7A05。当与α5β1复合时,A2-3B06和C-14D12不能结合传感器上的A-15B08,并且与rh-α5β1复合的A-15B08和A2-3B06不能结合传感器上的C-14D12。表12A和12B中的结果显示通过这6个抗体所代表的2个表位组。A2-7A05和A2-7F01代表一组,而A-15B08、A2-3B06、A2-5D10和C-14D12代表第二组。

[0339] 表12A

[0340]

固定化的mAb	第二mAb*	响应(nm)	响应%	竞争
A-15B08	C-14D12	-0.15	-72.85%	+

A-15B08	A-15B08	-0.15	-73.81%	+
A-15B08	A2-3B06	0.10	50.05%	+
A-15B08	无mAb	0.21	100.00%	对照
A-15B08	A2-5D10	0.22	106.82%	+
A-15B08	A2-7F01	0.29	142.59%	-
A-15B08	A2-7A05	0.31	150.63%	-
A2-7A05	A2-7A05	-0.17	-451.35%	+
A2-7A05	A2-7F01	-0.17	-472.70%	+
A2-7A05	无mAb	0.04	100.00%	对照
A2-7A05	A2-3B06	0.07	198.65%	-
A2-7A05	C-14D12	0.11	309.19%	-
A2-7A05	A2-5D10	0.17	448.38%	-
A2-7A05	A-15B08	0.25	666.22%	-
C-14D12	C-14D12	-0.11	-50.49%	+
C-14D12	A-15B08	-0.09	-38.40%	+
C-14D12	A2-3B06	0.12	53.28%	+
C-14D12	无mAb	0.22	100.00%	对照
C-14D12	A2-5D10	0.24	106.12%	+
C-14D12	A2-7F01	0.30	133.09%	-
C-14D12	A2-7A05	0.31	139.39%	-

[0341] ＊与20nM rh-α5β1预混合

[0342] 表12B

[0343]

		传感器上		
		A2-7A05	A-15B08	C-14D12
与α5β1预培育	A2-7A05	+	-	-
	A2-7F01	+	-	-
	C-14D12	-	+	+
	A-15B08	-	+	+
	A2-3B06	-	+	+
	A2-5D10	-	+	+

[0344] 实施例7:抗体结合破坏α5β1-FN整合素-配体复合物

[0345] 使用表面等离子共振(SPR)和细胞-基测定来测试抗体对结合至人FN蛋白的rh-α5β1蛋白的解离的影响。所测试的抗体代表了实施例6中所识别的两组抗体,它们限定了两个不同的表位结合组并且具有不同的配体阻断性质。它们是A-15B08,FN结合的强阻断剂,和A2-7A05,FN结合的部分阻断剂。另外,作为通过在配体结合口袋处的竞争抑制α5β1整合素与FN的结合的对比剂,测试了小分子拮抗剂环RGD(cRGD;Creative-Peptides,Shirley,New York,11967,产品目录号No.CP22175)。

[0346] 所使用的SPR法的描述:以40％的湿度,将溶于水中的FN蛋白手动印刷在裸露的金-涂覆的(厚度47nm)PlexArray Nanocapture传感器芯片(Plexera Bioscience,

Seattle,WA)上。将芯片在4℃,在80％湿度下培育过夜,并用10×PBST(0.1M磷酸盐缓冲液,1.54M NaCl,pH7.4,0.5％Tween20)漂洗10分钟(min),用1×PBST(0.01M磷酸盐缓冲液pH7.4,0.154MNaCl,0.05％Tween20)漂洗10min,并用去离子水漂洗两次,10min。然后,用5％(w/v)脱脂乳在水中的溶液封闭芯片过夜,并用10×PBST清洗10min,用1×PBST清洗10min,并用去离子水清洗两次,10min,然后在使用前在氮气流下干燥。使用高通量表面等离子共振成像(SPRi)平台PlexArray HT(PlexeraBioscience,Seattle,WA)进行SPR测量。使准直光(660nm)穿过耦合棱镜,从SPR-活性金表面反射掉并被CCD摄像机接收。通过非脉动活塞泵将缓冲剂和样品注入到安装在耦合棱镜上的30μL流通池中。每个SPR测量循环包含四个步骤:以2μL/秒(s)的恒定速度,用1×PBS运行缓冲液清洗以获得稳定基线,以5uL/s注入用于结合至FN的400nM rh-α5β1300s(以达到平衡),随后以2μL/s,注入单独的运行缓冲液50s以使得rh-α5β1解离,并且最后以2μL/s注入1μM抗体250s。在25℃进行所有测量。记录SPR结合响应(a.u.)并随时间作图。

[0347] 两种抗体对结合至FN的rh-α5β1蛋白的解离具有积极影响,但是程度不同,而cRGD无影响。图4A显示了添加和不添加抗体或cRGD的情况下,SPR响应的叠加。任一种抗体的注入导致SPR响应瞬时升高,这表明FN、rh-α5β1蛋白和抗体形成三元复合物。显著地,先前通过ELISA被证明是FN结合的强阻断剂的A-15B08抗体导致FN-α5β1复合物快速解离,如在注入抗体和测量SPR响应的250s期间,通过SPR响应降低接近至基线所检测的。A-15B08快速解离复合物的这种性质与在类似条件下通过其它抗-α5β1抗体显示出慢得多的解离速率的公开结果形成对比(Mould等人,J Bio Chem.,30;291(40):20993-21007(2016))。通过ELISA显示仅部分阻断α5β1与FN的结合的A2-7A05抗体不会引起SPR响应的这种快速降低,尽管的确以较慢速率导致部分解离,但这与Mould等人(2016)先前对于一些其它抗体所发表的结果相当。相反,小分子拮抗剂cRGD的注入不会对复合物的解离速率具有任何可分别的影响。两种抗体对rh-α5β1蛋白具有类似的结合亲和力(对于A-15B08和A2-7A05,K_D分别为1.31E-09和0.8E-09,还参见表9),从而表明通过这些抗体所引起的解离速率的差异不是结合亲和力的具体函数,而是结合相互作用的固有性质。如先前通过Mould等人(2016)所示,配体位点竞争性拮抗剂,如cRGD对于配体-整合素复合物的解离不如变构拮抗剂抗体有效,从而表明通过本文所测试的抗体观察到解离活性涉及变构机制。

[0348] 还测试了A-15B08和A2-7A05抗体以及cRGD诱导细胞α5β1整合素从FN解离的能力。已知最初来源于成胶质细胞瘤肿瘤的U87MG细胞(HTB-14™,ATCC,Manassas,VA)表达α5β1整合素并且贴壁至FN涂覆的板。在FN涂覆的板上培育过夜后,U87MG细胞形成宽松填充的单层并且具有延伸的纺缍体形状。如果例如,通过胰蛋白酶诱导细胞与板脱离,则连接点松动,并且细胞变圆。将这类形态变化用于评价抗体和小分子抑制剂cRGD是否可以诱导U87MG细胞从FN涂覆的板分离。

[0349] 将下列方法用于评价细胞脱离活性:通过在37℃培育50uL每孔在1×PBS中的32μg/mL FN 1小时,用FN(人纤连蛋白,R&D Systems,Minneapolis,MN 55413,产品目录号No.1918-FN)涂覆96-孔细胞培养板(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,产品目录号No.165306),然后用补充有10％胎牛血清(FBS;ATCC,Manassas,VA,产品目录号No.30-2021)的EMEM培养基(ATCC,Manassas,VA,产品目录号No.30-2003)清洗2×。将U87MG细胞以20,000个细胞每孔在EMEM培养基+10％FBS中铺板过夜以使得最大贴壁。第二天,用包括浓

度为2.0、0.4、0.08和0.016μg/mL的抗体A-15B08、A2-7A05或同种型对照IgG4或者浓度为20、4、0.8和0.16μM的cRGD的1:5稀释系列的新鲜培养基替换培养基。所有测试重复两次。评价细胞形态,并且使用ECHO Rebel光学显微镜(ECHO,San Diego,CA)的10×物镜采集图像。

[0350] 结果表明在低至0.4μg/mL抗体浓度,由于细胞接触脱离,作为强FN阻断抗体的代表的抗体A-15B08引起了显著的细胞变圆,在1小时和3小时观察到这种情况,后者是采集图像的时间(图4B)。部分拮抗剂A2-7A05也在0.4μg/mL抗体浓度显示出细胞脱离,但是水平低得多,并且仅在3小时明显。这种抗体使贴壁细胞脱离的较弱能力与它仅是部分抑制剂一致。IgG4同种型对照和cRGD处理不会在所测定的任何浓度或时间点显示出显著的细胞脱离(图4B)。两种抗体使细胞从FN涂覆的孔中脱离的程度与通过纯化蛋白所产生的SPR解离数据一致(图4A),其中强拮抗剂抗体引起整合素-FN复合物快速解离而部分拮抗剂仅微弱引起解离。

[0351] 实施例8:人IgG4嵌合体的产生和CDRH2中N-糖基化位点的除去不会显著影响抗体FN的阻断活性

[0352] 将抗体表达质粒构建为具有来自抗体A-15B08、C-14D12和A2-7A05的可变域的人IgG4嵌合体。另外,将抗体A-15B08的CDRH2中位置62处的苏氨酸残基改变为丙氨酸以除去假定的N-糖基化位点并且表示为IgG4克隆A-15B08-T62A。图2C和2D中显示了A-15B08-T62A的VH和VL序列以及6个CDR序列(根据多种编号方案)。使用Sanger测序验证序列的正确性,并且通过测量260nm波长下的吸光值确定质粒浓度。将表达克隆转染到混悬-适应的CHO K1细胞中并在无动物组分、无血清培养基中生长。通过离心和后续过滤(0.2μm过滤器)收获上清液。使用MabSelect™ SuRe™(Cytiva,Marlborough,MA)纯化抗体。以0.8mL/min,使用PBS作为运行缓冲液,通过具有Agilent AdvanceBio SEC柱(300A 2.7um 7.8×300mm;Agilent Technologies,Inc.,Santa Clara,CA)的分析型尺寸排阻色谱确定纯度。通过280nm的吸光值确定得率。全部4种嵌合抗体A-15B08、A-15B08-T62A、C-14D12和A2-7A05以高水平表达,其来自250mL培养的得率分别为55、53、43和24mg。

[0353] 通过在-80℃过夜储存,然后在冰上融化,重复三次,对每种嵌合体抗体的小等份测试冻融稳定性。如通过它们抑制α5β1整合素与纤连蛋白(FN)结合的能力所判断的,与仅在4℃储存的抗体相比,全部4种嵌合抗体对3×冻融循环稳定。所使用的ELISA方法如实施例2所述。使用GraphPad Prism 9.0.2版(GraphPad Software,LLC,San Diego,CA),通过ELISA数据的非线性回归分析曲线拟合(4-参数)(图5)计算IC50。所得IC50表明3×冻融(F/T)仅极低限度地影响抗体在FN-阻断测定中的效力(表13)。另外,将IgG4嵌合体的效力与使用相同FN-阻断ELISA和IC50确定方法所来源的小鼠杂交瘤的效力相比较。结果表明在任何情况下,嵌合体的效力比杂交瘤稍高约2-倍(参见图6&表14),除了其中差异较小的A2-7A05的情况(IC50 0.115vs.0.130)。

[0354] 表13

[0355]

抗体	IC50	
	4℃	3x F/T
A-15B08	0.015	0.017
A-15B08-T62A	0.018	0.020
C-14D12	0.021	0.023
A2-7A05	0.121	0.119

[0356] 表14

[0357]

抗体	IC50	
	杂交瘤	嵌合体
A-15B08	0.040	0.020
A-15B08-T62A	N/A	0.021
C-14D12	0.045	0.021
A2-7A05	0.130	0.115

[0358] 通过将其重链在SDS-PAGE中的移动性与在假定的N-糖基化位点NST中的重链可变域的位置62处含有T至A突变的A-15B08-T62A的移动性相比较,确定了A-15B08的糖基化状态。使用MOPS缓冲液(Invitrogen,Carlsbad,CA,产品目录号No.B0001),使用Bolt™ 4-12.5%Tris-Bis Plus(Invitrogen,Carlsbad,CA,产品目录号No.NW04120BOX)缩型蛋白凝胶,通过SDS-PAGE分离2μg的每种抗体。具有突变的N-糖基化位点的抗体重链A-15B08-T62A的移动性与来自不含假定的N-糖基化位点的C-14D12和A2-7A05的另外2条抗体重链类似地迁移。值得注意地,A-15B08的重链的迁移比另外3个抗体缓慢,从而提供了它在该位点的确糖基化的证据(图7)。基于该数据,预期抗体A2-5D10(未突变,也未通过SDS-PAGE测试)也将在其CDRH2中类似的NST序列处糖基化。

[0359] 实施例9:抗体与α5β1整合素的结合使其构象改变为无活性形式

[0360] 使用当整合素处于活性或打开构象时,优先结合1-链的抗体12G10(小鼠抗-人整合素β1/CD29抗体,NovusBiologicals,Littleton,CO,产品目录号No.NB100-63255),测定了抗-5抗体将整合素构象从活性调控至无活性构象的能力。通过在4℃培育过夜,用2μg/mL在0.2M碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液,pH9.4(Thermo Scientific,Rockford,IL,产品目录号No.28382)中的12G10抗体涂覆Nunc MaxiSorp平底96-孔板(Invitrogen,Waltham,MA,产品目录号No.44-2404-21)。然后,用清洗缓冲液(含有0.05%Tween20的1×Tris缓冲盐水)清洗板3次,然后用在1×TBS中的2%BSA在室温(RT)下封闭2小时。在含有0.05μg/mL rh-α5β1-加6×His标签的蛋白(Acro Biosystems,Newark,DE,产品目录号No.IT1-H52W5)和0.5mM MnC12(TEKnova,Hollister,CA,产品目录号No.M0350)的标准稀释剂(2%BSA,1×TBS 0.05%Tween20)中稀释抗体的人IgG4嵌合形式,以产生在10,000ng/mL至0.64ng/mL的范围内的7点1:5抗体稀释系列。除人IgG4嵌合抗体A-15B08、C-14D12和A2-7A05之外,所测试的三种其它抗体包括IgG4同种型对照(人IgG4,K,抗-荧光素Ab00102-13.0,Absolute Antibody,Wilton,UK)、已知将整合素α-5诱导成活性构象的抗-整合素α-5克隆SNAKA51(MilliporeSigma,St.Louis,MO,产品目录号No.MABT201)和最终本身可以直接与12G10竞

争对MaxiSorp板的结合的12G10抗体。对于测定,在除去封闭溶液并将孔清洗3次后,将100μL抗体稀释系列,加His-标签的-α5β1混合物加入至孔中。在RT下1小时后,清洗孔3次,与以1:1000处于标准稀释剂中的生物素化的抗-6×His-标签Ab(Invitrogen,Carlsbad,CA,产品目录号No.MAI-21315-BTIN)一起培育1小时,清洗3次,与聚HRP抗生蛋白链菌素(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,产品目录号No.N200)培育30分钟,清洗3次,与TMB底物(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,产品目录号No.N301)培育2-5分钟,随后添加ELISA终止溶液(Invitrogen,Carlsbad,CA,产品目录号No.SS04)。测量450nm的吸光值。对于每个稀释系列,将数据点归一化至不包含抗体的孔的吸光值,并报告为结合百分比。使用GraphPad Prism 9.0.2版(GraphPad Software,LLC,San Diego,CA),将非线性回归分析用于将曲线(3-参数)拟合至数据。图8中显示了结果。

[0361] 结果显示先前显示强烈抑制α5β1与FN的结合的两种抗体A-15B08和C-14D12将α5β1整合素与12G10的结合降低了约50％,而部分抑制与FN的结合的抗体A2-7A05不降低α5β1整合素与12G10的结合。IgG4同种型对照类似地不降低α5β1整合素与12G10的结合。已知将α5β1整合素改变为活性构象的SNAKA5 1抗体提高了α5β1整合素与12G10的结合。不受任何理论束缚,强烈抑制α5β1整合素与其第一配体FN的结合的抗体可以部分通过将α5β1整合素的构象改变为非活性构象状态来实现这种情况。

[0362] 实施例10:对纤连蛋白的细胞粘附的抗体抑制

[0363] 细胞表面α5β1整合素受体与FN相互作用以促进细胞粘附。为了测试人IgG4嵌合抗-α5β1抗体是否抑制粘附,开发了板-基细胞粘附测定以用于来源于成胶质细胞瘤肿瘤并且已知表达α5β1整合素的U87MG细胞系(HTB-14™,ATCC,Manassas,VA)。在5％CO2,37℃培育箱中,使U87MG细胞在补充有10％胎牛血清(FBS;ATCC,Manassas,VA,产品目录号No.30-2021)的EMEM培养基(ATCC,Manassas,VA,产品目录号No.30-2003)中生长至80％汇合。用0.05％胰蛋白酶、0.02％EDTA(Lifeline Cell Technology,Frederick,MD,产品目录号No.CM0017)使细胞与烧瓶解离,用含有钙和镁的改良的Dulbecco′s 1×PBS(DPBS)(HyClone,Logan,UT,产品目录号No.SH30028-02)清洗一次,并在无添加的EMEM培养基中以2,000,000个细胞每mL的细胞浓度再混悬。在96-孔聚丙烯圆底板中与最终浓度在3至0.01μg/mL的范围内的抗体的6点1:3稀释系列混合前,将细胞在保温箱中静息30分钟。将100,000个静息细胞与每种抗体稀释液预先混合至最终体积100μL,然后转移至人FN涂覆的96-孔板(R&D Systems,Minneapolis,MN,产品目录号No.CWP001)。将细胞-抗体混合物在37℃,5％CO2下培育1小时。通过将板在吸收垫上倒置,从孔除去非贴壁细胞,然后用无钙和镁的1×DPBS(EMD Millipore Corp,Billerica,MA,产品目录号No.TMS-012-A)每孔200uL清洗2×。以建议稀释(1:2000),将100μL含有Hoechst 33342染料(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,产品目录号No.62249)的1×DPBS加入至每个孔中以对核荧光染色以帮助细胞计数。使用ImageXpress Pico自动细胞成像系统(Molecular Devices,San Jose,CA)提供的图像分析软件对保持贴壁至孔的细胞计数,其基于对染色的核的荧光计数,在这种情况下使用DAPI过滤器检测Hoechst核染色。使用GraphPad Prism 9.0.2版(GraphPadSoftware,LLC,San Diego,CA),将非线性回归分析用于曲线(4-参数)拟合至数据。

[0364] 图9显示了结果。在不存在抗体的情况下贴壁至FN涂覆的孔的U87MG细胞的平均数为37,022,标准偏差(stdev)为2,364(n＝16)。来自无FN涂层的孔的细胞计数平均具有628

个细胞,其stdev为143(n=12)。对于作为FN结合的强阻断剂的抗体A-15B08、A-15B08-T62A和C-14D12,在3μg/mL测试的抗体的最高浓度抑制78%至86%的范围内的粘附,而显示作为FN结合的部分阻断剂的抗体A2-7A05抑制25%(表15)。来自该细胞粘附阻断测定的数据证实了本发明的抗体对α5β1与Fn的结合以及对细胞粘附的抑制作用。

[0365] 表15

[0366]

抗体	细胞计数(曲线底部)	细胞计数(曲线顶部)	抑制%	IC50
A-15B08 IgG4 嵌合体	4783	33768	86	0.12
A-15B08-T62A IgG4 嵌合体	6318	35447	82	0.15
C-14D12 IgG4 嵌合体	8044	37180	78	0.14
A2-7A05 IgG4 嵌合体	28819	38202	25	0.27
IgG4 同种型	31993	49996	N/A	N/A
无 mAb	34148	40905	N/A	N/A

实施方式

[0367] 1.与抗体竞争性地与α5β1整合素结合的抗体或其片段,所述抗体或其片段包含:

[0368] (A)(i)具有SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的轻链可变区;(ii)具有SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的轻链可变区;(iii)具有SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列的轻链可变区;(iv)具有SEQ ID NO:109所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:110所示的氨基酸序列的轻链可变区;(v)具有SEQ ID NO:135所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的轻链可变区;(vi)具有SEQ ID NO:136所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:137所示的氨基酸序列的轻链可变区;(vii)具有SEQ ID NO:138所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:139所示的氨基酸序列的轻链可变区;(viii)具有SEQ ID NO:144所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:145所示的氨基酸序列的轻链可变区;(ix)具有SEQ ID NO:146所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:147所示的氨基酸序列的轻链可变区;或

[0369] (B)(i)具有SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列的轻链可变区;(ii)具有SEQ ID NO:91所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:92所示的氨基酸序列的轻链可变区;(iii)具有SEQ ID NO:140所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:141所示的氨基酸序列的轻链可变区;和/或(iv)具有SEQ ID NO:142所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:143所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0370] 2.结合至α5β1整合素的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含:

[0371] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0372] (1)V_H CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:

[0373] (i)SEQ ID NO:1、27、53或93,

[0374] (ii)SEQ ID NO:7、31、59或97,

[0375] (iii)SEQ ID NO:12、34、64或100,

[0376] (iv)SEQ ID NO:13、35、65或101,和

[0377] (v)SEQ ID NO:18、38、70或105;

[0378] (2)V_H CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:

[0379] (i)SEQ ID NO:2、28、54或79,

[0380] (ii)SEQ ID NO:8、60或82,

[0381] (iii)SEQ ID NO:14、66或84,

[0382] (iv)SEQ ID NO:19、71或87,和

[0383] (v)SEQ ID NO:24、76或90;和

[0384] (3)V_H CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:

[0385] (i)SEQ ID NO:3、29、55、80或94,

[0386] (ii)SEQ ID NO:9、32、61、83或98,

[0387] (iii)SEQ ID NO:15、36、67、85或102,和

[0388] (iv)SEQ ID NO:20、39、72、88或106;

[0389] 和

[0390] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0391] (1)V_L CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:

[0392] (i)SEQ ID NO:4、30、44、56或95,

[0393] (ii)SEQ ID NO:10、33、46、62或99,

[0394] (iii)SEQ ID NO:16、37、47、68或103,和

[0395] (iv)SEQ ID NO:21、40、49、73或107;

[0396] (2)V_L CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:

[0397] (i)SEQ ID NO:5或57,

[0398] (ii)SEQ ID NO:11或63,和

[0399] (iii)SEQ ID NO:22、41或74;和

[0400] (3)V_L CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:

[0401] (i)SEQ ID NO:6、45、58、81或96

[0402] (ii)SEQ ID NO:17、48、69、86或104,和

[0403] (iii)SEQ ID NO:23、50、75、89或108。

[0404] 3.结合至α5β1整合素的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含重链可变(V_H)区,其包含:

[0405] (1)V_H CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:

[0406] (i)SEQ ID NO:1、27、53或93,

[0407] (ii)SEQ ID NO:7、31、59或97,

[0408] (iii)SEQ ID NO:12、34、64或100,

[0409] (iv)SEQ ID NO:13、35、65或101,和

[0410] (v)SEQ ID NO:18、38、70或105;

[0411] (2)V_H CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:

[0412] (i)SEQ ID NO:2、28、54或79,

[0413] (ii)SEQ ID NO:8、60或82,

[0414] (iii)SEQ ID NO:14、66或84,

[0415] (iv)SEQ ID NO:19、71或87,和

[0416] (v)SEQ ID NO:24、76或90;和

[0417] (3)V_H CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:

[0418] (i)SEQ ID NO:3、29、55、80或94,

[0419] (ii)SEQ ID NO:9、32、61、83或98,

[0420] (iii)SEQ ID NO:15、36、67、85或102,和

[0421] (iv)SEQ ID NO:20、39、72、88或106。

[0422] 4.结合至α5β1整合素的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含轻链可变(V_L)区,其包含:

[0423] (1)V_L CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:

[0424] (i)SEQ ID NO:4、30、44、56或95,

[0425] (ii)SEQ ID NO:10、33、46、62或99,

[0426] (iii)SEQ ID NO:16、37、47、68或103,和

[0427] (iv)SEQ ID NO:21、40、49、73或107;

[0428] (2)V_L CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:

[0429] (i)SEQ ID NO:5或57,

[0430] (ii)SEQ ID NO:11或63,和

[0431] (iii)SEQ ID NO:22、41或74;和

[0432] (3)V_L CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:

[0433] (i)SEQ ID NO:6、45、58、81或96,

[0434] (ii)SEQ ID NO:17、48、69、86或104,和

[0435] (iii)SEQ ID NO:23、50、75、89或108。

[0436] 5.结合至α5β1整合素的抗体或其片段,其包含全部3个重链互补决定区(CDR)或者全部3个轻链CDR,其来自:

[0437] 表示为A-15B08的抗体,其包含作为SEQ ID NO:25的VH序列和作为SEQ ID NO:26的VL序列;

[0438] 表示为A-15B08-T62A的抗体,其包含作为SEQ ID NO:135的VH序列和作为SEQ ID NO:26的VL序列;

[0439] 表示为A-15B08_Low的抗体,其包含作为SEQ ID NO:136的VH序列和作为SEQ ID NO:137的VL序列;

[0440] 表示为A-15B08_LoW+Mod的抗体,其包含作为SEQ ID NO:138的VH序列,和作为SEQ ID NO:139的VL序列;

[0441] 表示为A2-3B06的抗体,其包含作为SEQ ID NO:42的VH序列,和作为SEQ ID NO:43的VL序列;

[0442] 表示为A2-5D10的抗体,其包含作为SEQ ID NO:51的VH序列,和作为SEQ ID NO:52的VL序列;

[0443] 表示为A2-7A05的抗体,其包含作为SEQ ID NO:77的VH序列,和作为SEQ ID NO:78的VL序列;

[0444] 表示为A2-7A05_Low的抗体,其包含作为SEQ ID NO:140的VH序列,和作为SEQ ID NO:141的VL序列;

[0445] 表示为A2-7A05_Low+Mod的抗体,其包含作为SEQ ID NO:142的VH序列,和作为SEQ ID NO:143的VL序列;

[0446] 表示为A2-7F01的抗体,其包含作为SEQ ID NO:91的VH序列,和作为SEQ ID NO:92的VL序列;

[0447] 表示为C-14D12的抗体,其包含作为SEQ ID NO:109的VH序列,和作为SEQ ID NO:110的VL序列;

[0448] 表示为C-14D12_Low的抗体,其包含作为SEQ ID NO:144的VH序列,和作为SEQ ID NO:145的VL序列;或

[0449] 表示为C-14D12_Low+Mod的抗体,其包含作为SEQ ID NO:146的VH序列,和作为SEQ ID NO:147的VL序列。

[0450] 6.根据实施方式5所述的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含来自表示为A-15B08的抗体的全部三个重链CDR和全部三个轻链CDR。

[0451] 7.根据实施方式5所述的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含来自表示为A2-3B06的抗体的全部三个重链CDR和全部三个轻链CDR。

[0452] 8.根据实施方式5所述的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含来自表示为A2-5D10的抗体的全部三个重链CDR和全部三个轻链CDR。

[0453] 9.根据实施方式5所述的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含来自表示为A2-7A05的抗体的全部三个重链CDR和全部三个轻链CDR。

[0454] 10.根据实施方式5所述的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含来自表示为A2-7F01的抗体的全部三个重链CDR和全部三个轻链CDR。

[0455] 11.根据实施方式5所述的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含来自表示为C-14D12的抗体的全部三个重链CDR和全部三个轻链CDR。

[0456] 12.结合至α5β1整合素的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0457] (a)重链可变(V_H)区,其包含如表1-6中所示的V_H CDR1、V_H CDR2和V_H CDR3氨基酸序列;

[0458] 或

[0459] (b)轻链可变(V_L)区,其包含如表1-6中所示的V_L CDR1、V_L CDR2和V_L CDR3氨基酸序列。

[0460] 13.根据实施方式12所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0461] (a)重链可变(V_H)区,其包含如表1-6中所示的V_H CDR1、V_H CDR2和V_H CDR3氨基酸序列;

[0462] 和

[0463] (b)轻链可变(V_L)区,其包含如表1-6中所示的V_L CDR1、V_L CDR2和V_L CDR3氨基酸序列。

[0464] 14.根据实施方式12所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含重链可变(V_H)区,其包含如表1-6中所示的V_H CDR1、V_H CDR2和V_H CDR3氨基酸序列。

[0465] 15.根据实施方式12所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含轻链可变(V_L)区,其

包含如表1-6中所示的V_L CDR1、V_L CDR2和V_L CDR3氨基酸序列。

[0466] 16.根据实施方式12所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0467] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0468] (1)V_H CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、7、12、13和18;

[0469] (2)V_H CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、8、14、19和24;和

[0470] (3)V_H CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、9、15和20;

[0471] 和

[0472] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0473] (1)V_L CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、10、16和21;

[0474] (2)V_L CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:5、11和22;和

[0475] (3)V_L CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:6、17和23。

[0476] 17.根据实施方式16所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0477] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0478] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:1所示的V_H CDR1;

[0479] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:2所示的V_H CDR2;和

[0480] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:3所示的V_H CDR3;

[0481] 和

[0482] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0483] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:4所示的V_L CDR1;

[0484] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:5所示的V_L CDR2;和

[0485] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:6所示的V_L CDR3。

[0486] 18.根据实施方式16所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0487] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0488] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:7所示的V_H CDR1;

[0489] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:8所示的V_H CDR2;和

[0490] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:9所示的V_H CDR3;

[0491] 和

[0492] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0493] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:10所示的V_L CDR1;

[0494] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:11所示的V_L CDR2;和

[0495] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:6所示的V_L CDR3。

[0496] 19.根据实施方式16所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0497] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0498] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:12所示的V_H CDR1;

[0499] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:2所示的V_H CDR2;和

[0500] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:3所示的V_H CDR3;

[0501] 和

[0502] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0503] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:4所示的V_L CDR1;

[0504] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:5所示的V_L CDR2;和

[0505] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:6所示的V_L CDR3。

[0506] 20.根据实施方式16所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0507] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0508] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:13所示的V_H CDR1;

[0509] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:14所示的V_H CDR2;和

[0510] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:15所示的V_H CDR3;

[0511] 和

[0512] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0513] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:16所示的V_L CDR1;

[0514] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:11所示的V_L CDR2;和

[0515] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:17所示的V_L CDR3。

[0516] 21.根据实施方式16所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0517] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0518] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:18所示的V_H CDR1;

[0519] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:19所示的V_H CDR2;和

[0520] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:20所示的V_H CDR3;

[0521] 和

[0522] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0523] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:21所示的V_L CDR1;

[0524] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:22所示的V_L CDR2;和

[0525] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:23所示的V_L CDR3。

[0526] 22.根据实施方式16所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0527] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0528] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:1所示的V_H CDR1;

[0529] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:24所示的V_H CDR2;和

[0530] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:3所示的V_H CDR3;

[0531] 和

[0532] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0533] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:4所示的V_L CDR1;

[0534] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:5所示的V_L CDR2;和

[0535] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:6所示的V_L CDR3。

[0536] 23.根据实施方式12所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0537] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0538] (1)V_H CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:27、31、34、35和38;

[0539] (2)V_H CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:8、14、19、24和28;和

[0540] (3)V_H CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:29、32、36和39;

[0541] 和

[0542] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0543] (1)V_L CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:30、33、37和40;

[0544] (2)V_L CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:5、11和41和

[0545] (3)V_L CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:6、17和23。

[0546] 24.根据实施方式23所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0547] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0548] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:27所示的V_H CDR1;

[0549] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:28所示的V_H CDR2;和

[0550] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:29所示的V_H CDR3;和

[0551] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0552] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:30所示的V_L CDR1;

[0553] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:5所示的V_L CDR2;和

[0554] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:6所示的V_L CDR3。

[0555] 25.根据实施方式23所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0556] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:31所示的V_H CDR1;

[0557] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:8所示的V_H CDR2;和

[0558] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:32所示的V_H CDR3;和(b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0559] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:33所示的V_L CDR1;

[0560] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:11所示的V_L CDR2;和

[0561] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:6所示的V_L CDR3。

[0562] 26.根据实施方式23所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0563] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:34所示的V_H CDR1;

[0564] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:28所示的V_H CDR2;和

[0565] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:29所示的V_H CDR3;和(b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0566] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:30所示的V_L CDR1;

[0567] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:5所示的V_L CDR2;和

[0568] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:6所示的V_L CDR3。

[0569] 27.根据实施方式23所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0570] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:35所示的V_H CDR1;

[0571] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:14所示的V_H CDR2;和

[0572] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:36所示的V_H CDR3;和(b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0573] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:37所示的V_L CDR1;

[0574] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:11所示的V_L CDR2;和

[0575] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:17所示的V_L CDR3。

[0576] 28.根据实施方式23所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0577] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:38所示的V_H CDR1;

[0578] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:19所示的V_H CDR2;和

[0579] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:39所示的V_H CDR3;

[0580] 和

[0581] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0582] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:40所示的V_L CDR1;

[0583] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:41所示的V_L CDR2;和

[0584] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:23所示的V_L CDR3。

[0585] 29.根据实施方式23所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0586] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0587] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:27所示的V_H CDR1;

[0588] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:24所示的V_H CDR2;和

[0589] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:29所示的V_H CDR3;

[0590] 和

[0591] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0592] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:30所示的V_L CDR1;

[0593] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:5所示的V_L CDR2;和

[0594] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:6所示的V_L CDR3。

[0595] 30.根据实施方式12所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0596] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0597] (1)V_H CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、7、12、13和18;

[0598] (2)V_H CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、8、14、19和24;和

[0599] (3)V_H CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、9、15和20;

[0600] 和

[0601] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0602] (1)V_L CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:44、46、47和49;

[0603] (2)V_L CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:5、11和22;和

[0604] (3)V_L CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:45、48和50。

[0605] 31.根据实施方式30所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0606] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0607] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:1所示的V_H CDR1;

[0608] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:2所示的V_H CDR2;和

[0609] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:3所示的V_H CDR3;

[0610] 和

[0611] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0612] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:44所示的V_L CDR1;

[0613] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:5所示的V_L CDR2;和

[0614] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:45所示的V_L CDR3。

[0615] 32.根据实施方式30所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0616] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:7所示的V_H CDR1;

[0617] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:8所示的V_H CDR2;和

[0618] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:9所示的V_H CDR3;和(b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0619] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:46所示的V_L CDR1;

[0620] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:11所示的V_L CDR2;和

[0621] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:45所示的V_L CDR3。

[0622] 33.根据实施方式30所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0623] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:12所示的V_H CDR1;

[0624] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:2所示的V_H CDR2;和

[0625] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:3所示的V_H CDR3;和(b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0626] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:44所示的V_L CDR1;

[0627] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:5所示的V_L CDR2;和

[0628] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:45所示的V_L CDR3。

[0629] 34.根据实施方式30所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0630] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:13所示的V_H CDR1;

[0631] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:14所示的V_H CDR2;和

[0632] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:15所示的V_H CDR3;和(b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0633] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:47所示的V_L CDR1;

[0634] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:11所示的V_L CDR2;和

[0635] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:48所示的V_L CDR3。

[0636] 35.根据实施方式30所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0637] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:18所示的V_H CDR1;

[0638] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:19所示的V_H CDR2;和

[0639] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:20所示的V_H CDR3;和

[0640] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0641] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:49所示的V_L CDR1;

[0642] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:22所示的V_L CDR2;和

[0643] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:50所示的V_L CDR3。

[0644] 36.根据实施方式30所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0645] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0646] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:1所示的V_H CDR1;

[0647] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:24所示的V_H CDR2;和

[0648] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:3所示的V_H CDR3;

[0649] 和

[0650] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0651] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:44所示的V_L CDR1;

[0652] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:5所示的V_L CDR2;和

[0653] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:45所示的V_L CDR3。

[0654] 37.根据实施方式12所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0655] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0656] (1)V_H CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:53、59、64、65和70;

[0657] (2)V_H CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:54、60、66、71和76;和

[0658] (3)V_H CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:55、61、67和72;

[0659] 和

[0660] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0661] (1)V_L CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:56、62、68和73;

[0662] (2)V_L CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:57、63和74;和

[0663] (3)V_L CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:58、69和75。

[0664] 38.根据实施方式37所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0665] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0666] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:53所示的V_H CDR1;

[0667] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:54所示的V_H CDR2;和

[0668] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:55所示的V_H CDR3;

[0669] 和

[0670] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0671] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:56所示的V_L CDR1;

[0672] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:57所示的V_L CDR2;和

[0673] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:58所示的V_L CDR3。

[0674] 39.根据实施方式37所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0675] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:59所示的V_H CDR1;

[0676] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:60所示的V_H CDR2;和

[0677] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:61所示的V_H CDR3;和(b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0678] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:62所示的V_L CDR1;

[0679] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:63所示的V_L CDR2;和

[0680] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:58所示的V_L CDR3。

[0681] 40.根据实施方式37所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0682] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:64所示的V_H CDR1;

[0683] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:54所示的V_H CDR2;和

[0684] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:55所示的V_H CDR3;和(b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0685] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:56所示的V_L CDR1;

[0686] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:57所示的V_L CDR2;和

[0687] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:58所示的V_L CDR3。

[0688] 41.根据实施方式37所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)重链可变(V_H)

区,其包含:

[0689] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:65所示的V_H CDR1;

[0690] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:66所示的V_H CDR2;和

[0691] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:67所示的V_H CDR3;和(b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0692] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:68所示的V_L CDR1;

[0693] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:63所示的V_L CDR2;和

[0694] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:69所示的V_L CDR3。

[0695] 42.根据实施方式37所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0696] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:70所示的V_H CDR1;

[0697] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:71所示的V_H CDR2;和

[0698] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:72所示的V_H CDR3;和(b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0699] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:73所示的V_L CDR1;

[0700] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:74所示的V_L CDR2;和

[0701] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:75所示的V_L CDR3。

[0702] 43.根据实施方式37所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0703] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0704] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:53所示的V_H CDR1;

[0705] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:76所示的V_H CDR2;和

[0706] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:55所示的V_H CDR3;

[0707] 和

[0708] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0709] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:56所示的V_L CDR1;

[0710] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:57所示的V_L CDR2;和

[0711] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:58所示的V_L CDR3。

[0712] 44.根据实施方式12所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0713] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0714] (1)V_H CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:53、59、64、65和70;

[0715] (2)V_H CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:79、82、84、87和90;和

[0716] (3)V_H CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:80、83、85和88;

[0717] 和

[0718] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0719] (1)V_L CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:56、62、68和73;

[0720] (2)V_L CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:57、63和74;和

[0721] (3)V_L CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:81、86和89。

[0722] 45.根据实施方式44所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0723] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0724] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:53所示的V_H CDR1;

[0725] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:79所示的V_H CDR2;和

[0726] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:80所示的V_H CDR3;

[0727] 和

[0728] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0729] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:56所示的V_L CDR1;

[0730] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:57所示的V_L CDR2;和

[0731] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:81所示的V_L CDR3。

[0732] 46.根据实施方式44所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0733] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0734] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:59所示的V_H CDR1;

[0735] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:82所示的V_H CDR2;和

[0736] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:83所示的V_H CDR3;和

[0737] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0738] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:62所示的V_L CDR1;

[0739] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:63所示的V_L CDR2;和

[0740] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:81所示的V_L CDR3。

[0741] 47.根据实施方式44所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0742] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:64所示的V_H CDR1;

[0743] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:79所示的V_H CDR2;和

[0744] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:80所示的V_H CDR3;和(b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0745] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:56所示的V_L CDR1;

[0746] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:57所示的V_L CDR2;和

[0747] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:81所示的V_L CDR3。

[0748] 48.根据实施方式44所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0749] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:65所示的V_H CDR1;

[0750] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:84所示的V_H CDR2;和

[0751] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:85所示的V_H CDR3;和(b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0752] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:68所示的V_L CDR1;

[0753] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:63所示的V_L CDR2;和

[0754] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:86所示的V_L CDR3。

[0755] 49.根据实施方式44所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0756] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:70所示的V_H CDR1;

[0757] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:87所示的V_H CDR2;和

[0758] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:88所示的V_H CDR3;和(b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0759] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:73所示的V_L CDR1;

[0760] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:74所示的V_L CDR2;和

[0761] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:89所示的V_L CDR3。

[0762] 50.根据实施方式44所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0763] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:53所示的V_H CDR1;

[0764] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:90所示的V_H CDR2;和

[0765] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:80所示的V_H CDR3;

[0766] 和

[0767] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0768] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:56所示的V_L CDR1;

[0769] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:57所示的V_L CDR2;和

[0770] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:81所示的V_L CDR3。

[0771] 51.根据实施方式12所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0772] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0773] (1)V_H CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:93、97、100、101和105;

[0774] (2)V_H CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:8、14、19、24和28;和

[0775] (3)V_H CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:94、98、102和106;

[0776] 和

[0777] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0778] (1)V_L CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:95、99、103和107;

[0779] (2)V_L CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:5、11和22;和

[0780] (3)V_L CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:96、104和108。

[0781] 52.根据实施方式51所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0782] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0783] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:93所示的V_H CDR1;

[0784] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:28所示的V_H CDR2;和

[0785] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:94所示的V_H CDR3;

[0786] 和

[0787] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0788] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:95所示的V_L CDR1;

[0789] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:5所示的V_L CDR2;和

[0790] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:96所示的V_L CDR3。

[0791] 53.根据实施方式51所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:

[0792] (a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0793] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:97所示的V_H CDR1;

[0794] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:8所示的V_H CDR2;和

[0795] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:98所示的V_H CDR3;

[0796] 和

[0797] (b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0798] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:99所示的V_L CDR1;

[0799] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:11所示的V_L CDR2;和

[0800] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:96所示的V_L CDR3。

[0801] 54.根据实施方式51所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0802] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:100所示的V_H CDR1;

[0803] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:28所示的V_H CDR2;和

[0804] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:94所示的V_H CDR3;和(b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0805] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:95所示的V_L CDR1;

[0806] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:5所示的V_L CDR2;和

[0807] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:96所示的V_L CDR3。

[0808] 55.根据实施方式51所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0809] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:101所示的V_H CDR1;

[0810] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:14所示的V_H CDR2;和

[0811] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:102所示的V_H CDR3;和(b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0812] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:103所示的V_L CDR1;

[0813] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:11所示的V_L CDR2;和

[0814] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:104所示的V_L CDR3。56.根据实施方式51所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0815] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:105所示的V_H CDR1;

[0816] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:19所示的V_H CDR2;和

[0817] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:106所示的V_H CDR3;和(b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0818] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:107所示的V_L CDR1;

[0819] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:22所示的V_L CDR2;和

[0820] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:108所示的V_L CDR3。57.根据实施方式51所述的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)重链可变(V_H)区,其包含:

[0821] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:93所示的V_H CDR1;

[0822] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:24所示的V_H CDR2;和

[0823] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:94所示的V_H CDR3;和(b)轻链可变(V_L)区,其包含:

[0824] (1)具有氨基酸序列SEQ ID NO:95所示的V_L CDR1;

[0825] (2)具有氨基酸序列SEQ ID NO:5所示的V_L CDR2;和

[0826] (3)具有氨基酸序列SEQ ID NO:96所示的V_L CDR3。

[0827] 58.根据实施方式12-57中任一项所述的抗体或其片段,其中所述V_H区或V_L区还包含人框架序列。

[0828] 59.根据实施方式58所述的抗体或其片段,其中所述V_H区和V_L区还包含人框架序列。

[0829] 60.根据实施方式12-57中任一项所述的抗体或其片段,其中所述V_H区或V_L区还包含框架1(FR1)、框架2(FR2)、框架3(FR3)或者框架4(FR4)序列。

[0830] 61.根据实施方式60所述的抗体或其片段,其中所述V_H区和V_L区还包含框架1(FR1)、框架2(FR2)、框架3(FR3)和框架4(FR4)序列。

[0831] 62.根据实施方式1-61中任一项所述的抗体或其片段,其中所述抗体是单克隆抗体。

[0832] 63.根据实施方式62所述的抗体或其片段,其中所述单克隆抗体是人源化抗体、人抗体或嵌合抗体。

[0833] 64.根据实施方式1-63中任一项所述的抗体或其片段,其是Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv、scFv、$(scFv)_2$、单链抗体分子、双重可变区抗体、单可变区抗体、线性抗体、V区或者由抗体片段形成的多重特异性抗体。

[0834] 65.根据实施方式1-64中任一项所述的抗体或其片段,其是缀合或重组融合至诊断试剂、可检测试剂或治疗剂。

[0835] 66.根据实施方式65所述的抗体或其片段,其中所述治疗剂是化疗剂、细胞毒素或药物。

[0836] 67.结合剂,其结合至与根据实施方式1-66中任一项所述的抗体或其片段基本相同的表位。

[0837] 68.根据实施方式67所述的结合剂,其是抗体或其片段。

[0838] 69.根据实施方式67所述的结合剂,其包含非抗体蛋白质骨架。

[0839] 70.根据实施方式69所述的结合剂,其中所述非抗体蛋白质骨架包括纤连蛋白骨架、抗运载蛋白、纤连蛋白(adnectin)、亲和体(affibody)、DARPin、fynomer、affitin、affilin、高亲和性多聚体(avimer)、富含半胱氨酸的打结素(knottin)肽或者工程化Kunitz型抑制剂。

[0840] 71.结合剂,其与根据实施方式1-66中任一项所述的抗体或其片段竞争性地与人α5β1整合素结合。

[0841] 72.根据实施方式71所述的结合剂,其中所述结合剂是抗体或其片段。

[0842] 73.一种或多种载体,其包含编码根据实施方式1-66中任一项所述的抗体或其片段的一种或多种多核苷酸。

[0843] 74.药物组合物,其包含根据实施方式1-63中任一项所述的抗体或其片段和药物可用的载体。

[0844] 75.治疗受试者中α5β1整合素-介导的疾病、病症或病况的方法,其包括向所述受试者施用根据权利要求1-66中任一项所述的抗体或其片段或者根据实施方式74所述的药物组合物。

[0845] 76.减轻受试者中与α5β1整合素-介导的疾病、病症或病况有关的一种或多种症状的方法,其包括向所述受试者施用根据实施方式1-66中任一项所述的抗体或其片段或者根据实施方式74所述的药物组合物。

[0846] 77.治疗受试者中癌症或肿瘤的方法,其包括向所述受试者施用根据实施方式1-66中任一项所述的抗体或其片段或者根据实施方式74所述的药物组合物。

[0847] 78.减轻受试者中与癌症或肿瘤有关的一种或多种症状的方法,其包括向所述受试者施用根据实施方式1-66中任一项所述的抗体或其片段或者根据实施方式74所述的药物组合物。

[0848] 79.治疗受试者中血管生成-介导的疾病、病症或病况的方法,其包括向所述受试者施用根据实施方式1-66中任一项所述的抗体或其片段或者根据实施方式74所述的药物组合物。

[0849] 80.减轻受试者中与血管生成-介导的疾病、病症或病况有关的一种或多种症状的方法,其包括向所述受试者施用根据实施方式1-66中任一项所述的抗体或其片段或者根据实施方式74所述的药物组合物。

[0850] 81.治疗受试者中炎性疾病、病症或病况的方法,其包括向所述受试者施用根据实施方式1-66中任一项所述的抗体或其片段或者根据实施方式74所述的药物组合物。

[0851] 82.减轻受试者中与炎性疾病、病症或病况有关的一种或多种症状的方法,其包括向所述受试者施用根据实施方式1-66中任一项所述的抗体或其片段或者根据实施方式74所述的药物组合物。

[0852] 83.根据实施方式75-82中任一项所述的方法,其中与所述抗体或其片段或者所述药物组合物组合,向所述受试者施用一种或多种治疗剂。

[0853] 本发明还包括以下实施方式:

[0854] 1.与抗体竞争性地与α5β1整合素结合的抗体或其片段,所述抗体或其片段包含:

[0855] (A)(i)具有SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的轻链可变区;(ii)具有SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的轻链可变区;(iii)具有SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列的轻链可变区;(iv)具有SEQ ID NO:109所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:110所示的氨基酸序列的轻链可变区;(v)具有SEQ ID NO:135所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的轻链可变区;(vi)具有SEQ ID NO:136所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:137所示的氨基酸序列的轻链可变区;(vii)具有SEQ ID NO:138所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:139所示的氨基酸序列的轻链可变区;(viii)具有SEQ ID NO:144所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:145所示的氨基酸序列的轻链可变区;(ix)具有SEQ ID NO:146所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:147所示的氨基酸序列的轻链可变区;或

[0856] (B)(i)具有SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列的轻链可变区;(ii)具有SEQ ID NO:91所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:92所示的氨基酸序列的轻链可变区;(iii)具有SEQ ID NO:140所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:141所示的氨基酸序列的轻链可变区;和/或(iv)具有SEQ ID NO:142所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:143所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0857] 2.根据实施方式1所述的抗体或其片段,其结合至α5β1整合素并且包含:(i)如SEQ ID NO:25中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,和/或如SEQ ID NO:26中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;(ii)如SEQ ID NO:42所示的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3,和/或如SEQ ID NO:43中所示的VL CDR1、VL CDR2和VLCDR3;(iii)如SEQ ID NO:51中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,和/或如SEQ ID NO:52中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;(iv)如SEQ ID NO:77中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,和/或如SEQ ID NO:78中所示的VL CDR1、

VL CDR2和VL CDR3;(v)如SEQ ID NO:91中所示的VH CDR1、VH CDR2和VHCDR3,和/或如SEQ ID NO:92中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;(vi)如SEQ ID NO:109中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,和/或如SEQ ID NO:110中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;(vii)如SEQ ID NO:135中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,和/或如SEQ ID NO:26中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;(viii)如SEQ ID NO:136中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,和/或如SEQ ID NO:137中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;(ix)如SEQ ID NO:138中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,和/或如SEQ ID NO:139中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;(x)如SEQ ID NO:140中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,和/或如SEQ ID NO:141中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;(xi)如SEQ ID NO:142中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,和/或如SEQ ID NO:143中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;(xii)如SEQ ID NO:144中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,和/或如SEQ ID NO:145中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;或(xiii)如SEQ ID NO:146中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,和/或如SEQ ID NO:147中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

[0858] 3.根据实施方式1所述的抗体或其片段,其结合至α5β1整合素并且包含:

[0859] (a)重链可变(VH)区,其包含如表1-6中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3氨基酸序列;

[0860] 或

[0861] (b)轻链可变(VL)区,其包含如表1-6所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3氨基酸序列。

[0862] 4.根据实施方式3所述的抗体或其片段,其包含:

[0863] (a)重链可变(VH)区,其包含如表1-6中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3氨基酸序列;

[0864] 和

[0865] (b)轻链可变(VL)区,其包含如表1-6中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3氨基酸序列。

[0866] 5.根据实施方式3所述的抗体或其片段,其包含重链可变(VH)区,其包含如表1-6中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3氨基酸序列。

[0867] 6.根据实施方式3所述的抗体或其片段,其包含轻链可变(VL)区,其包含如表1-6中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3氨基酸序列。

[0868] 7.根据实施方式1所述的抗体或其片段,其结合至α5β1整合素并且包含:

[0869] (a)重链可变(VH)区,其包含:

[0870] (1)VH CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、7、12、13和18;

[0871] (2)VH CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、8、14、19和24;和

[0872] (3)VH CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、9、15和20;

[0873] 和

[0874] (b)轻链可变(VL)区,其包含:

[0875] (1)VL CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、10、16和21;

[0876] (2)VL CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:5、11和22;和

[0877] (3)VL CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:6、17和23。

[0878] 8.根据实施方式1所述的抗体或其片段,其结合至α5β1整合素并且包含:

[0879] (a)重链可变(VH)区,其包含:

[0880] (1)VH CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:27、31、34、35和38;

[0881] (2)VH CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:8、14、19、24和28;和

[0882] (3)VH CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:29、32、36和39;

[0883] 和

[0884] (b)轻链可变(VL)区,其包含:

[0885] (1)VL CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:30、33、37和40;

[0886] (2)VL CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:5、11和41;和

[0887] (3)VL CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:6、17和23。

[0888] 9.根据实施方式1所述的抗体或其片段,其结合至α5β1整合素并且包含:

[0889] (a)重链可变(VH)区,其包含:

[0890] (1)VH CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、7、12、13和18;

[0891] (2)VH CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、8、14、19和24;和

[0892] (3)VH CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、9、15和20;

[0893] 和

[0894] (b)轻链可变(VL)区,其包含:

[0895] (1)VL CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:44、46、47和49;

[0896] (2)VL CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:5、11和22;和

[0897] (3)VL CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:45、48和50。

[0898] 10.根据实施方式1所述的抗体或其片段,其结合至α5β1整合素并且包含:

[0899] (a)重链可变(VH)区,其包含:

[0900] (1)VH CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:53、59、64、65和70;

[0901] (2)VH CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:54、60、66、71和76;和

[0902] (3)VH CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:55、61、67和72;

[0903] 和

[0904] (b)轻链可变(VL)区,其包含:

[0905] (1)VL CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:56、62、68和73;

[0906] (2)VL CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:57、63和74;和

[0907] (3)VL CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:58、69和75。

[0908] 11.根据实施方式1所述的抗体或其片段,其结合至α5β1整合素并且包含:

[0909] (a)重链可变(VH)区,其包含:

[0910] (1)VH CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:53、59、64、65和70;

[0911] (2)VH CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:79、82、84、87和90;和

[0912] (3)VH CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:80、83、85和88;

[0913] 和

[0914] (b)轻链可变(VL)区,其包含:

[0915] (1)VL CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:56、62、68和73;

[0916] (2)VL CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:57、63和74;和

[0917] (3)VL CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:81、86和89。

[0918] 12.根据实施方式1所述的抗体或其片段,其结合至α5β1整合素并且包含:

[0919] (a)重链可变(VH)区,其包含:

[0920] (1)VH CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:93、97、100、101和105;

[0921] (2)VH CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:8、14、19、24和28;和

[0922] (3)VH CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:94、98、102和106;

[0923] 和

[0924] (b)轻链可变(VL)区,其包含:

[0925] (1)VL CDR1,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:95、99、103和107;

[0926] (2)VL CDR2,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:5、11和22;和

[0927] (3)VL CDR3,其具有选自下列的氨基酸序列:SEQ ID NO:96、104和108。

[0928] 13.根据实施方式3-12中任一项所述的抗体或其片段,其中所述VH区或VL区还包含人框架序列。

[0929] 14.根据实施方式13所述的抗体或其片段,其中所述VH区和VL区还包含人框架序列。

[0930] 15.根据实施方式3-12中任一项所述的抗体或其片段,其中所述VH区或VL区还包含框架1(FR1)、框架2(FR2)、框架3(FR3)或者框架4(FR4)序列。

[0931] 16.根据实施方式15所述的抗体或其片段,其中所述VH区和VL区还包含框架1(FR1)、框架2(FR2)、框架3(FR3)和框架4(FR4)序列。

[0932] 17.根据实施方式1-16中任一项所述的抗体或其片段,其中所述抗体是单克隆抗体。

[0933] 18.根据实施方式17所述的抗体或其片段,其中所述单克隆抗体是人源化抗体、人抗体或嵌合抗体。

[0934] 19.根据实施方式1-18中任一项所述的抗体或其片段,其是Fab、Fab′、F(ab′)2、Fv、scFv、$(scFv)_2$、单链抗体分子、双重可变区抗体、单可变区抗体、线性抗体、V区或者由抗体片段形成的多重特异性抗体。

[0935] 20.根据实施方式1-19中任一项所述的抗体或其片段,其是缀合或重组融合至诊断试剂、可检测试剂或治疗剂。

[0936] 21.根据实施方式20所述的抗体或其片段,其中所述治疗剂是化疗剂、细胞毒素或药物。

[0937] 22.结合剂,其结合至与根据实施方式1-21中任一项所述的抗体或其片段基本相同的表位。

[0938] 23.根据实施方式22所述的结合剂,其是抗体或其片段。

[0939] 24.根据实施方式22所述的结合剂,其包含非抗体蛋白质骨架。

[0940] 25.根据实施方式24所述的结合剂,其中所述非抗体蛋白质骨架包括纤连蛋白骨架、抗运载蛋白、纤连蛋白(adnectin)、亲和体(affibody)、DARPin、fynomer、afiitin、affilin、高亲和性多聚体(avimer)、富含半胱氨酸的打结素(knottin)肽或者工程化Kunitz型抑制剂。

[0941] 26.结合剂,其与根据实施方式1-21中任一项所述的抗体或其片段竞争性地与人α

5整合素结合。

[0942] 27.根据实施方式26所述的结合剂,其中所述结合剂是抗体或其片段。

[0943] 28.载体,其包含编码根据实施方式1-21中任一项所述的抗体或其片段的一种或多种多核苷酸。

[0944] 29.宿主细胞,其包含根据实施方式28所述的载体。

[0945] 30.组合物,其包含根据实施方式1-21中任一项所述的抗体或其片段和药物可用的载体。

[0946] 31.治疗受试者中α5β1整合素-介导的疾病、病症或病况的方法,其包括向所述受试者施用根据实施方式1-21中任一项所述的抗体或其片段或根据实施方式30所述的组合物。

[0947] 32.减轻受试者中与α5β1整合素-介导的疾病、病症或病况有关的一种或多种症状的方法,其包括向所述受试者施用根据实施方式1-21中任一项所述的抗体或其片段或根据实施方式30所述的组合物。

[0948] 33.治疗受试者中癌症或肿瘤的方法,其包括向所述受试者施用根据实施方式1-21中任一项所述的抗体或其片段或根据实施方式30所述的组合物。

[0949] 34.减轻受试者中与癌症或肿瘤有关的一种或多种症状的方法,其包括向所述受试者施用根据实施方式1-21中任一项所述的抗体或其片段或者根据实施方式30所述的药物组合物。

[0950] 35.用于治疗受试者中血管生成-介导的疾病、病症或病况的方法,其包括向所述受试者施用根据实施方式1-21中任一项所述的抗体或其片段或根据实施方式30所述的组合物。

[0951] 36.减轻受试者中与癌症或肿瘤有关的一种或多种症状的方法,其包括向所述受试者施用根据实施方式1-21中任一项所述的抗体或其片段或根据实施方式30所述的组合物。

[0952] 37.治疗受试者中炎性疾病、病症或病况的方法,其包括向所述受试者施用根据实施方式1-21中任一项所述的抗体或其片段或者根据实施方式30所述的药物组合物。

[0953] 38.减轻受试者中与炎性疾病、病症或病况有关的一种或多种症状的方法,其包括向所述受试者施用根据实施方式1-21中任一项所述的抗体或其片段或根据实施方式30所述的组合物。

[0954] 39.根据实施方式31-38中任一项所述的方法,其中与所述抗体或其片段或者所述药物组合物组合向所述受试者施用一种或多种治疗剂。

[0955] 在整个发明申请中,已参考了多个专利公开、专利、专利申请及其它文档。在本发明申请中,这些专利公开、专利、专利申请及其它文档的公开内容出于所有目的,包括为了更全面描述本文所公开的主题所属的现有技术,以其全部内容作为参考并入本文。尽管已参考以上提供的实施例描述了所公开的主题,但是应理解可以在不背离所公开的主题的精神的情况下,做出多种改变。通过审阅本说明书,多种改变将对于本领域技术人员来说是显而易见的。

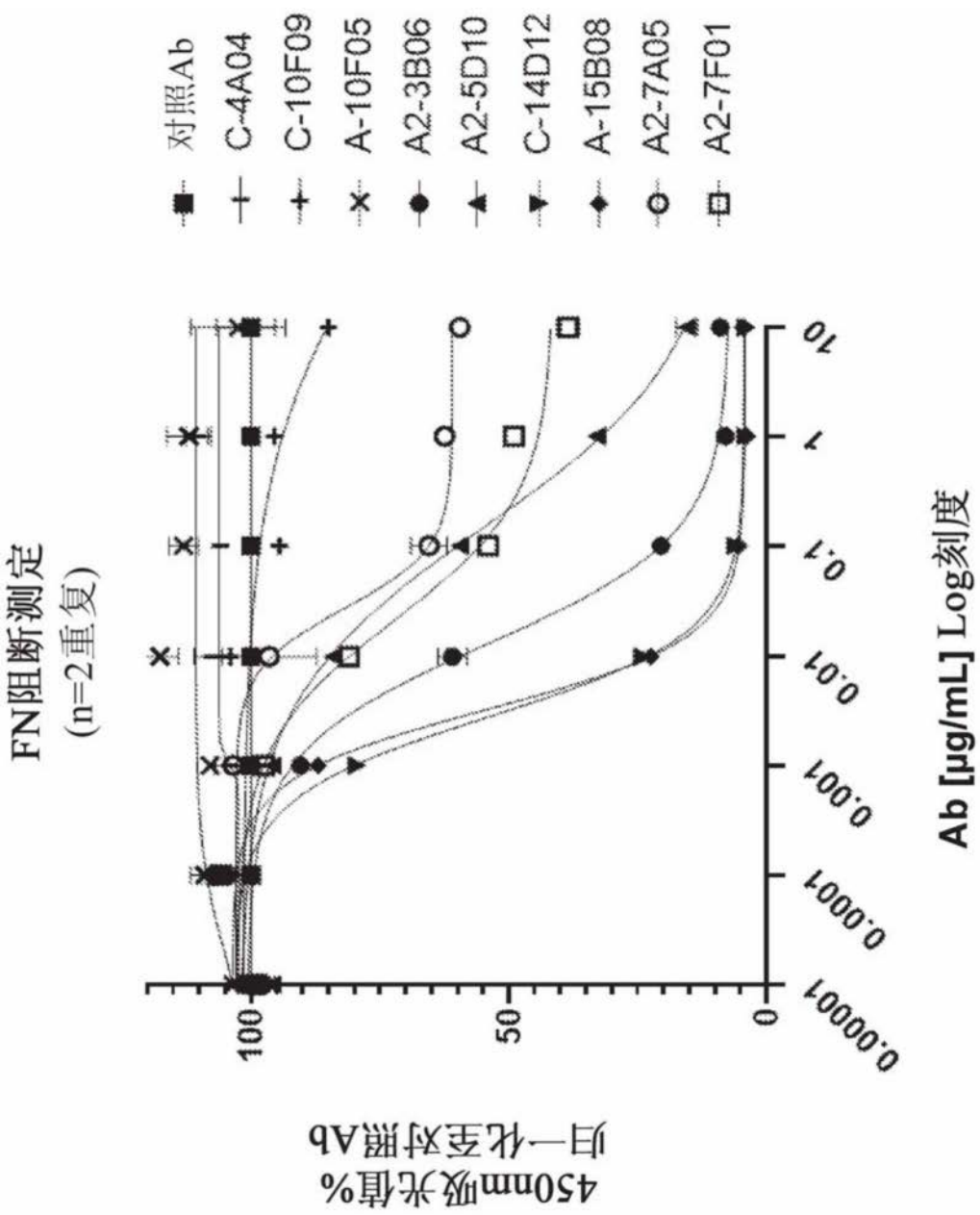

对照Ab
C-4A04
C-10F09
A-10F05
A2-3B06
A2-5D10
C-14D12
A-15B08
A2-7A05
A2-7F01
FN阻断测定
(n=2重复)
450nm吸光值%
归一化至对照Ab
100
50
0
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0.00001
Ab [μg/mL] Log刻度

图1

```
VH结构域
Kabat      1     10        22          31--35    40          50--a------60---65
AbM        1     10        22    26----ab---35   40          50--a----58      65
Chothia    1     10        22    26----ab32      40              a-55         65
Contact    1     10        22       30ab---35    40     47-------a----58      65
IMGT       1               23    27--------38  41          56------65        74
A-15B08    QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTIS GFSLT--SYGVH WVRQPPGKGLEWLV VIW-SDGSTTYNSTLKS
A2-3B06    QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTIS GFSLT--TYGVH WVRQPPGKGLEWLV VIW-SDGSTTYNSALKS
A2-5D10    QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTIS GFSLT--SYGVH WVRQPPGKGLEWLV VIW-SDGSTTYNSTLKS
C-14D12    QVQLKESGPDLVAPSQSLSITCTVS GFSLT--DYGVH WVRQPPGKGLEWLV VIW-SDGSTTYNSALKS
共有序列                             GFSLT--xYGVH                VIW-SDGSTTYxSxLKS
                                  (SEQ ID NO:120)                 (SEQ ID NO:121)

A2-7A05    QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAS GYTFT--IYWIN WVKQRPGQGLEWIG KIYPGSISTDYNEKFKS
A2-7F01    QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAS GYTFT--IYWIN WVKQRPGQGLEWIG NIYPGSSSTNYNEKFKT
共有序列                             GYTFT--IYWIN                xIYPGSxSTxYNEKFKx
                                  (SEQ ID NO:127)                 (SEQ ID NO:128)
```

图2A

```
                                                
```

```
VL结构域
Kabat     1    10        20   24-27------34      40          50----56
AbM       1    10        20   24----30a--34      40          50----56
Chothia   1    10        20      26-----32       40          50--
Contact   1    10        20         30a-----36   40   46----------55
IMGT      1                23   27----38  41                56-65 69
                                                              | |
A-15B08   QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTC TASSRVSSNSLH WYQQKPGSSPKLWIY STSNLAS
A2-3B06   QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTC TASSSVSSNSFH WYQQKPGSSPKLWLY STSNLAS
A2-5D10   QILLTQSPAIMSASLGERVTMTC TASSSVSSRCLH WYQQKPGSSPKLWIY STSNLAS
C-14D12   QIVLTQSPAIMSASLGERVTLTC TASSVTSSFLH WYQQKPGSSPKLWIY STSNLAS
共有序列                          TASSxVxSxxxH                STSNLAS
                                  (SEQ ID NO:124)          (SEQ ID NO:125)

A2-7A05   ENVLTQSPAIMSASLGEKVTMTC RASSSVN--YMY WYQQKSDASPKLWIY FTSSLAP
A2-7F01   ENVLTQSPAIMSASLGEKVTMSC RASSSVN--YMY WYQQKSDASPKLWIY FTSSLAP
共有序列                          RASSSVN--YMY                FTSSLAP
                                  (SEQ ID NO:130)          (SEQ ID NO:131)
```

图2B

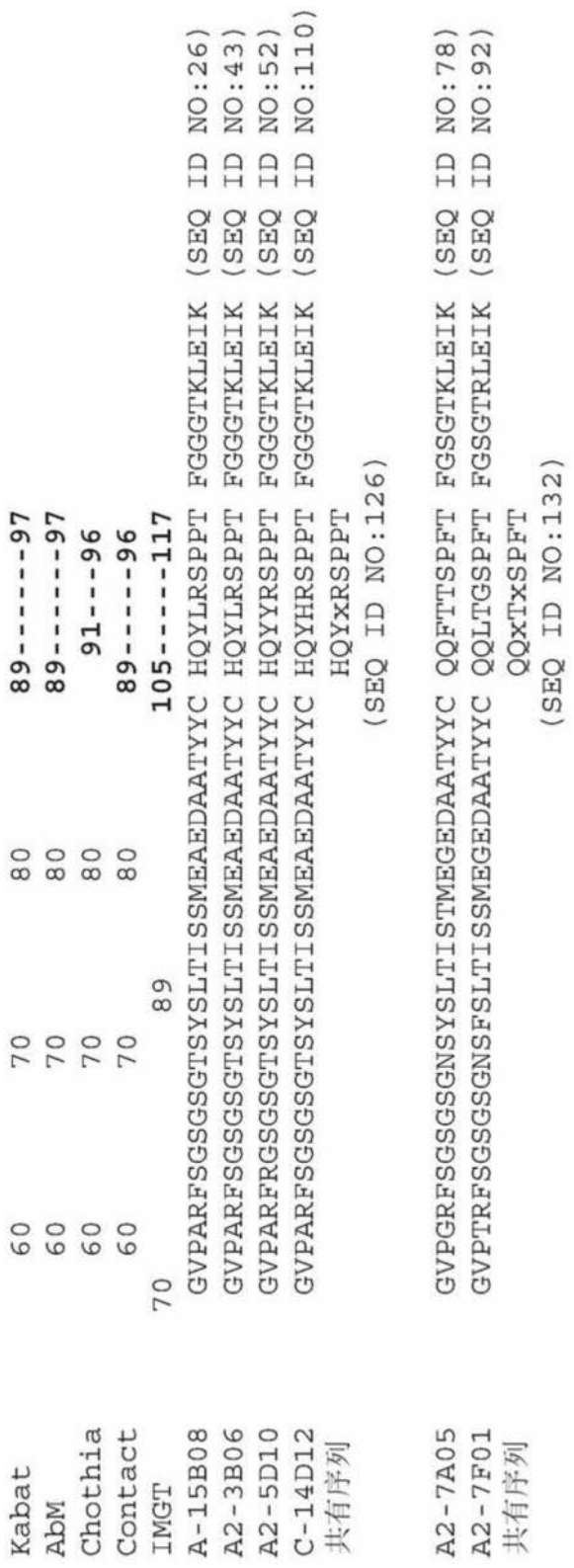

Kabat 60 70 80 89-----97
AbM 60 70 80 89-----97
Chothia 60 70 80 91---96
Contact 60 70 80 89----96
IMGT 70 89 105----117
A-15B08 GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC HQYLRSPPT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:26)
A2-3B06 GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC HQYLRSPPT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:43)
A2-5D10 GVPARFRGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC HQYYRSPPT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:52)
C-14D12 GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC HQYHRSPPT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:110)
共有序列 HQYxRSPPT
(SEQ ID NO:126)
A2-7A05 GVPGRFSGSGSGNSYSLTISTMEGEDAATYYC QQFTTSPFT FGSGTKLEIK (SEQ ID NO:78)
A2-7F01 GVPTRFSGSGSGNSFSLTISSMEGEDAATYYC QQLTGSPFT FGSGTRLEIK (SEQ ID NO:92)
共有序列 QQxTxSPFT
(SEQ ID NO:132)

图2B(续)

```
VH结构域
Kabat                1       10        22          31--35    40          50---------60---65
AbM                  1       10        22       26-------35  40          50-------58     65
Chothia              1       10        22       26----32     40             -55          65
Contact              1       10        22          30---35   40      47-------------58   65
IMGT                 1                 23       27-----38  41             56----65       74
A-15B08-T62A         QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTIS GFSLTSYGVH WVRQPPGKGLEWLV VIWSDGSTTYNSALKS
A-15B08_HC_Low       QVTLKESGPTLVKPTQTLTITCTIS GFSLTSYGVH WVRQPPGKGLEWLV VIWSDGSTTYNSALKS
A-15B08_HC_Low+Mod   QVTLKESGPTLVKPTQTLTITCTIS GFSLTSYGVH WVRQPPGKALEWLV VIWSDGSTTYNSSLKS

Kabat                   70        80  abc       90    95-------102      110
AbM                     70        80  abc       90    95-------102      110
Chothia                 70        80  abc       90       96-----101     110
Contact                 70        80  abc       90 93-------------101    110
IMGT                 75              89          105--------------117
A-15B08-T62A         RLSISKDNSKSQVFFKMNSLQTDDTAMYYCAR HYDYDGDWFAY WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:135)
A-15B08_HC_Low       RLTISKDNSKSQVVFTMTNLDTVDTAMYYCAR HYDYDGDWFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:136)
A-15B08_HC_Low+Mod   RLTISKDTSKNQVVFTMTNLDTVDTATYYCAR HYDYDGDWFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:138)
```

图2C

```
VL结构域
Kabat                1      10        20  24-27------34      40          50----56
AbM                  1      10        20  24----30a--34      40          50----56
Chothia              1      10        20     26------32      40          50--
Contact              1      10        20          30a-----36  40   46----------55
IMGT                 1                    23   27----38  41                56-65 69
                                                                          | |
A-15B08-T62A*        QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTC TASSRVSSNSLH WYQQKPGSSPKLWIY STSNLAS
A-15B08_LC_Low       EIVLTQSPGIMSASLGERVTMSC RASSRVSSNSLH WYQQKPGQSPKLWIY STSNRAS
A-15B08_LC_Low+Mod   EIVLTQSPGILSASLGERVTMSC RASSRVSSNSLH WYQQKPGQAPRLWIY STSNRAT

                     60        70        80          89------97
Kabat                60        70        80          89------97
AbM                  60        70        80            91---96
Chothia              60        70        80          89------96
Contact              60        70        80                   105-----117
IMGT                 70                  89
A-15B08-T62A*        GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC HQYLRSPPT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:26)
A-15B08_LC_Low       GVPDRFSGSGSGTDYTLTISRMEAEDFATYYC HQYLRSPPT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:137)
A-15B08_LC_Low+Mod   GVPDRFSGSGSGTDYTLTISRMEAEDFATYYC HQYLRSPPT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:139)

*在A-15B08和A-15B08-T62A之间，VL结构域序列相同
```

图2D

```
VH结构域
Kabat          1     10        22          31--35    40          50--a------60---65
AbM            1     10        22       26-------35  40          50--a----58     65
Chothia        1     10        22       26----32     40             a-55         65
Contact        1     10        22          30---35   40       47-------a----58   65
IMGT           1                23       27-----38  41             56------65     74
A2-7A05_HC               QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAS GYTFTIYWIN WVKQRPGQGLEWIG KIYPGSISTDYNEKFKS
A2-7A05_HC_Low           QVQLVQPGAEVVKPGASVKLSCKAS GYTFTIYWIN WVKQAPGQGLEWIG KIYPGSISTDYNEKFKG
A2-7A05_HC_Low+Mod       QVQLVQPGAEVVKPGASVKLSCKAS GYTFTIYWIN WVRQAPGQGLEWIG KIYPGSISTDYNQKFQG

Kabat          70        80  abc       90    95----102      110
AbM            70        80  abc       90    95----102      110
Chothia        70        80  abc       90       96--101     110
Contact        70        80  abc       90 93-------101      110
IMGT        75              89                105-------117
A2-7A05_HC               KATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYYCAI TGTGGLAY WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:77)
A2-7A05_HC_Low           KATLTVDTSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAI TGTGGLAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:140)
A2-7A05_HC_Low+Mod       RATLTVDTSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAI TGTGGLAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:142)
```

图2E

```
VL结构域
Kabat                1       10        20   24-27----34      40          50----56
AbM                  1       10        20   24----30-34      40          50----56
Chothia              1       10        20      26---32       40          50--
Contact              1       10        20           30----36  40      46----------55
IMGT                 1                    23   27--38   41                56-65 69
                                                                          | |
A2-7A05_LC           ENVLTQSPAIMSASLGEKVTMTC RASSSVNYMY WYQQKSDASPKLWIY FTSSLAP
A2-7A05_LC_Low       ENVLTQSPGIMSASLGERVTMSC RASSSVNYMY WYQQKSGQSPKLWIY FTSSRAP
A2-7A05_LC_Low+Mod   ENVLTQSPGILSASLGERVTMSC RASSSVNYMY WYQQKSGQAPRLWIY FTSSRAP

Kabat                60      70        80      89------97
AbM                  60      70        80      89------97
Chothia              60      70        80        91--96
Contact              60      70        80      89-----96
IMGT                 70          89          105----117
A2-7A05_LC           GVPGRFSGSGSGNSYSLTISTMEGEDAATYYC QQFTTSPFT FGSGTKLEIK (SEQ ID NO:78)
A2-7A05_LC_Low       GVPDRFSGSGSGTSYTLTISRMEGEDFATYYC QQFTTSPFT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:141)
A2-7A05_LC_Low+Mod   GVPDRFSGSGSGTSYTLTISRMEGEDFATYYC QQFTTSPFT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:143)
```

图2F

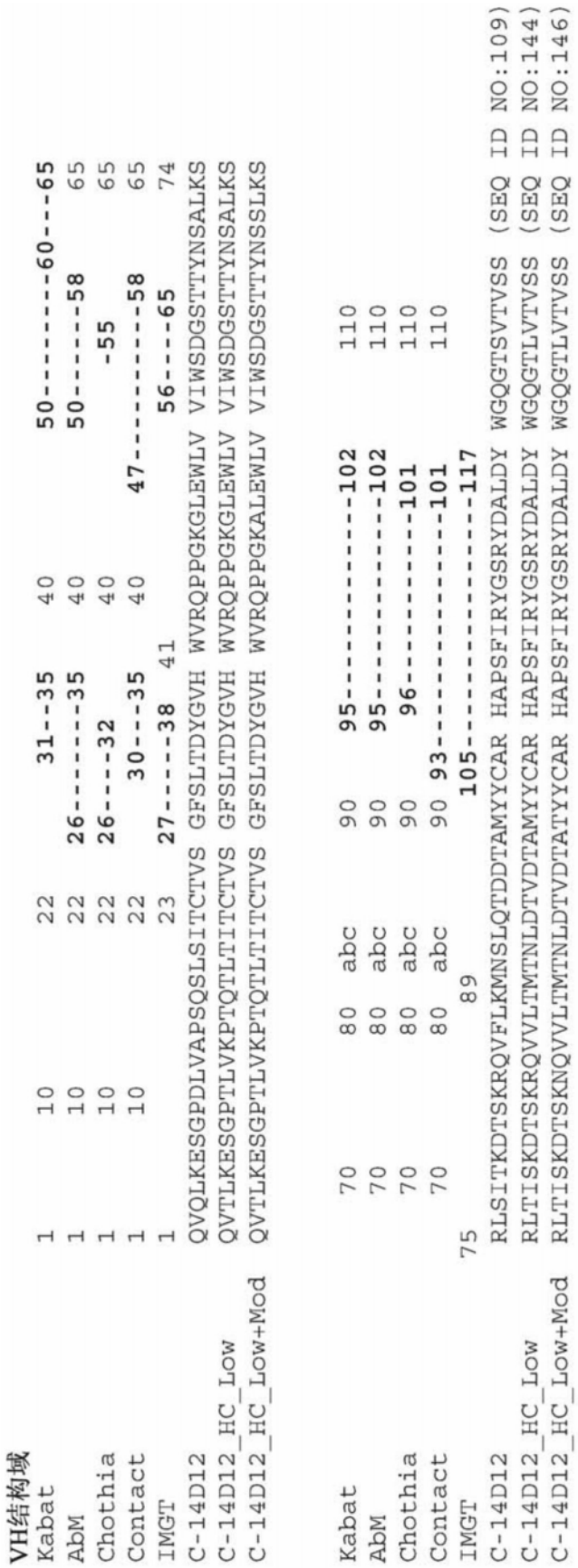

VH结构域
Kabat 1 10 22 31--35 40 50--------60---65
AbM 1 10 22 26-------35 40 50------58 65
Chothia 1 10 22 26----32 40 -55 65
Contact 1 10 22 30---35 40 47----------58 65
IMGT 1 23 27-----38 41 56----65 74
C-14D12 QVQLKESGPDLVAPSQSLSITCTVS GFSLTDYGVH WVRQPPGKGLEWLV VIWSDGSTTYNSALKS
C-14D12_HC_Low QVTLKESGPTLVKPTQTLTITCTVS GFSLTDYGVH WVRQPPGKGLEWLV VIWSDGSTTYNSALKS
C-14D12_HC_Low+Mod QVTLKESGPTLVKPTQTLTITCTVS GFSLTDYGVH WVRQPPGKALEWLV VIWSDGSTTYNSSLKS
Kabat 70 80 abc 90 95----------102 110
AbM 70 80 abc 90 95----------102 110
Chothia 70 80 abc 90 96----------101 110
Contact 70 80 abc 90 93----------101 110
IMGT 75 89 105----------117
C-14D12 RLSITKDTSKRQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAR HAPSFIRYGSRYDALDY WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:109)
C-14D12_HC_Low RLTISKDTSKRQVVLTMTNLDTVDTAMYYCAR HAPSFIRYGSRYDALDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:144)
C-14D12_HC_Low+Mod RLTISKDTSKNQVVLTMTNLDTVDTATYYCAR HAPSFIRYGSRYDALDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:146)

图2G

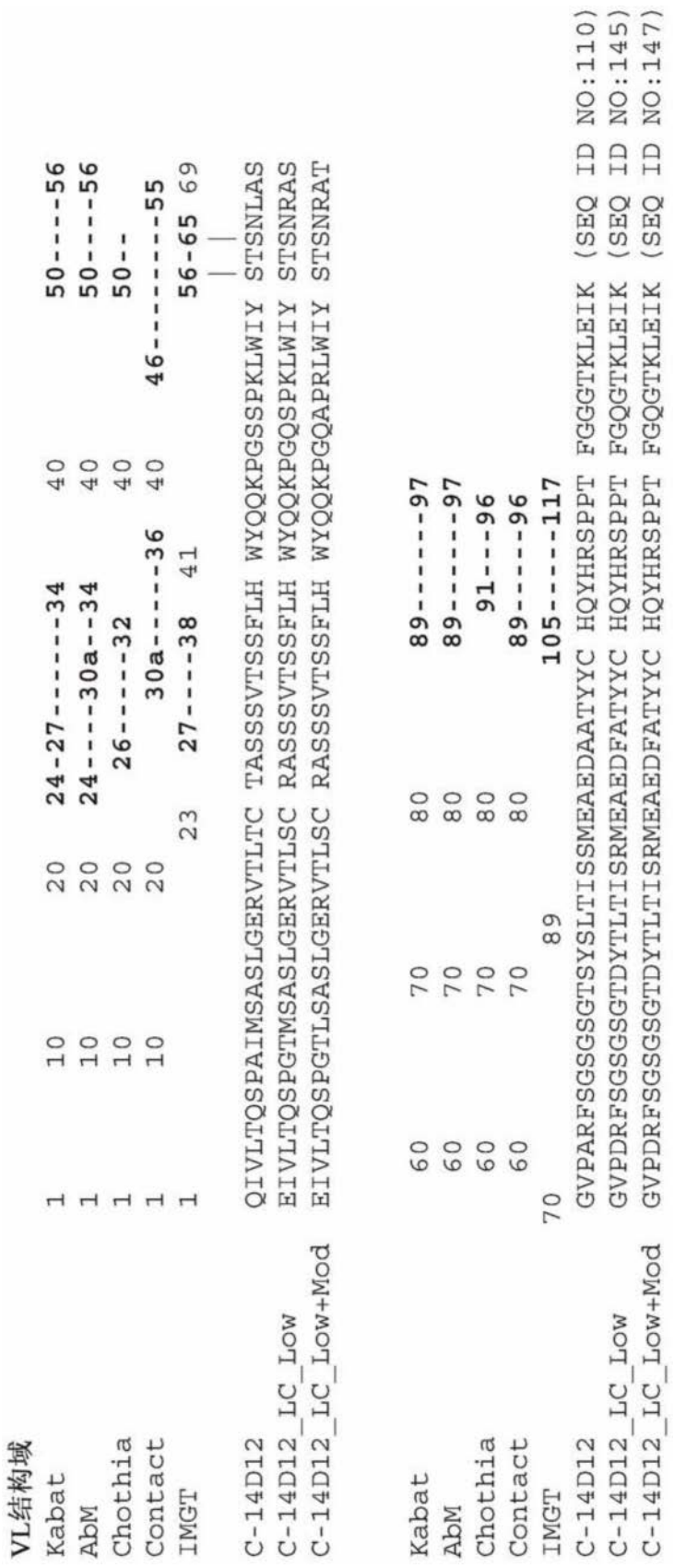

VL结构域
Kabat 1 10 20 24-27------34 40 50----56
AbM 1 10 20 24----30a--34 40 50----56
Chothia 1 10 20 26------32 40 50--
Contact 1 10 20 30a-----36 40 46----------55
IMGT 1 23 27----38 41 56-65 69
C-14D12 QIVLTQSPAIMSASLGERVTLTC TASSSVTSSFLH WYQQKPGSSPKLWIY STSNLAS
C-14D12_LC_Low EIVLTQSPGTMSASLGERVTLSC RASSSVTSSFLH WYQQKPGQSPKLWIY STSNRAS
C-14D12_LC_Low+Mod EIVLTQSPGTLSASLGERVTLSC RASSSVTSSFLH WYQQKPGQAPRLWIY STSNRAT
Kabat 60 70 80 89------97
AbM 60 70 80 89------97
Chothia 60 70 80 91---96
Contact 60 70 80 89-----96
IMGT 70 89 105----117
C-14D12 GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC HQYHRSPPT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:110)
C-14D12_LC_Low GVPDRFSGSGSGTDYTLTISRMEAEDFATYYC HQYHRSPPT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:145)
C-14D12_LC_Low+Mod GVPDRFSGSGSGTDYTLTISRMEAEDFATYYC HQYHRSPPT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:147)

图2H

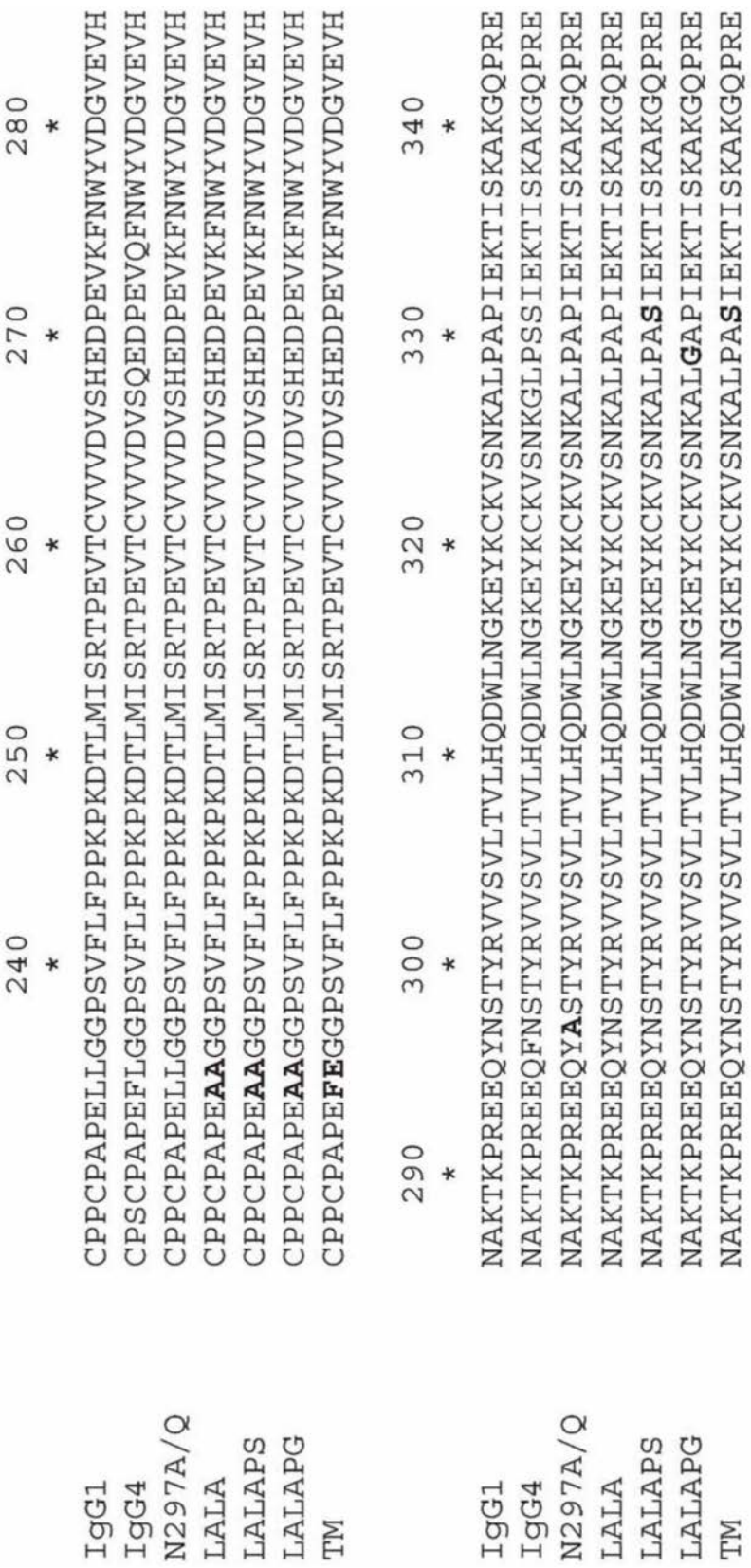

240 250 260 270 280
IgG1 CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
IgG4 CPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
N297A/Q CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
LALA CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
LALAPS CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
LALAPG CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
TM CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
290 300 310 320 330 340
IgG1 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
IgG4 NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
N297A/Q NAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
LALA NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
LALAPS NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPRE
LALAPG NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE
TM NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPRE

图3

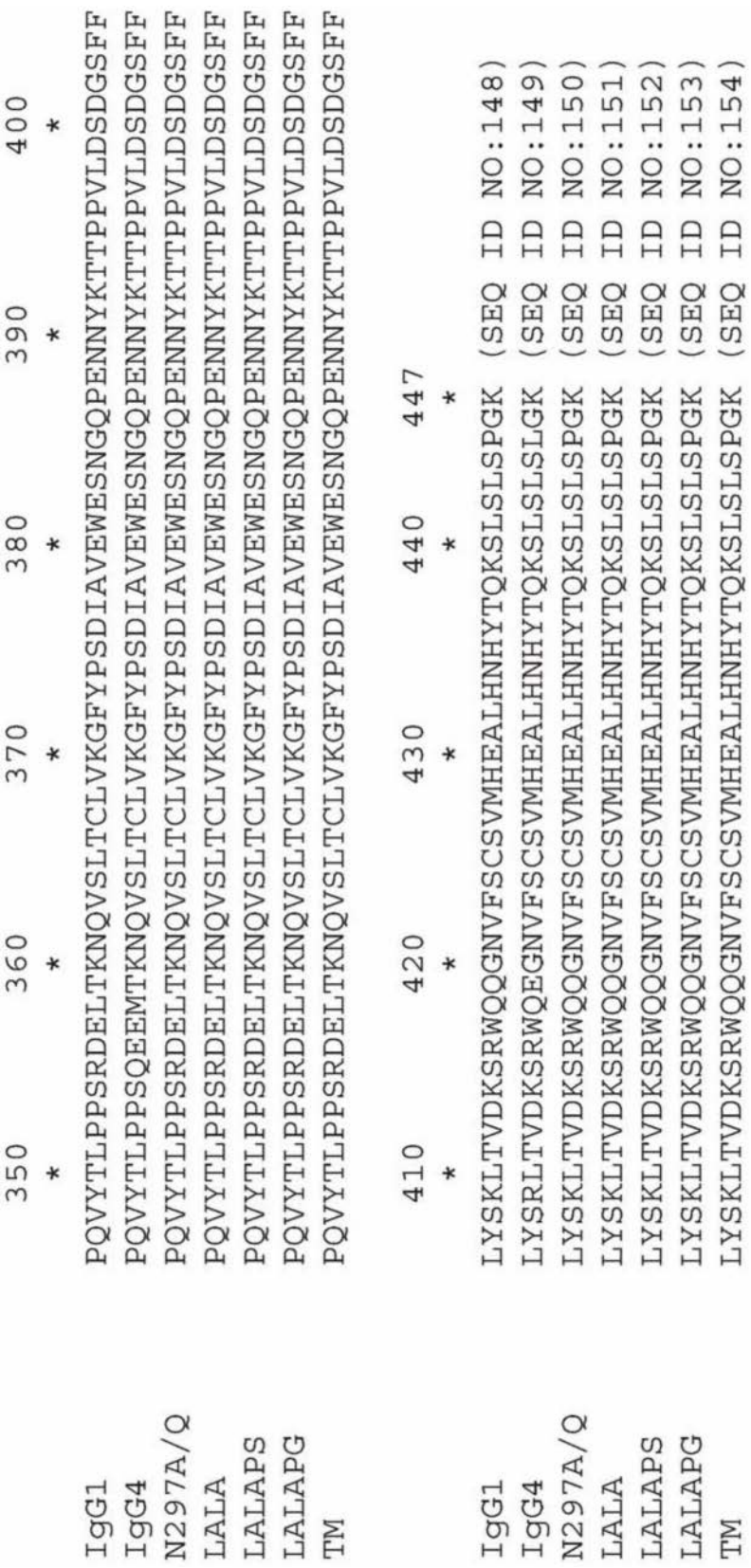

350 360 370 380 390 400
IgG1 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
IgG4 PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
N297A/Q PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LALA PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LALAPS PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LALAPG PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
TM PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
410 420 430 440 447
IgG1 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:148)
IgG4 LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:149)
N297A/Q LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:150)
LALA LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:151)
LALAPS LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:152)
LALAPG LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:153)
TM LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:154)

图3(续)

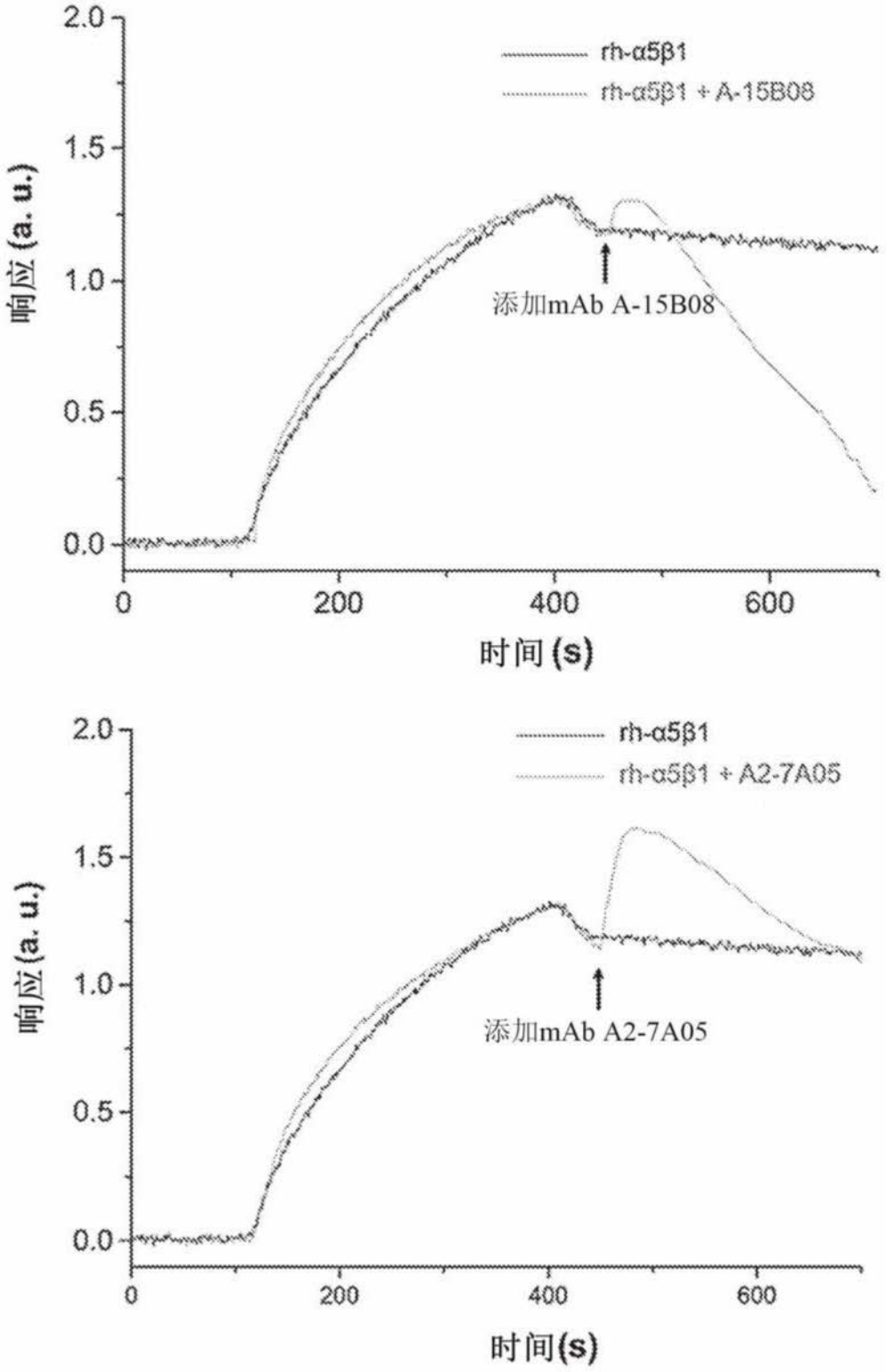

rh-α5β1
rh-α5β1 + A-15B08
添加mAb A-15B08
响应(a. u.)
时间(s)
rh-α5β1
rh-α5β1 + A2-7A05
添加mAb A2-7A05
响应(a. u.)
时间(s)

图4A

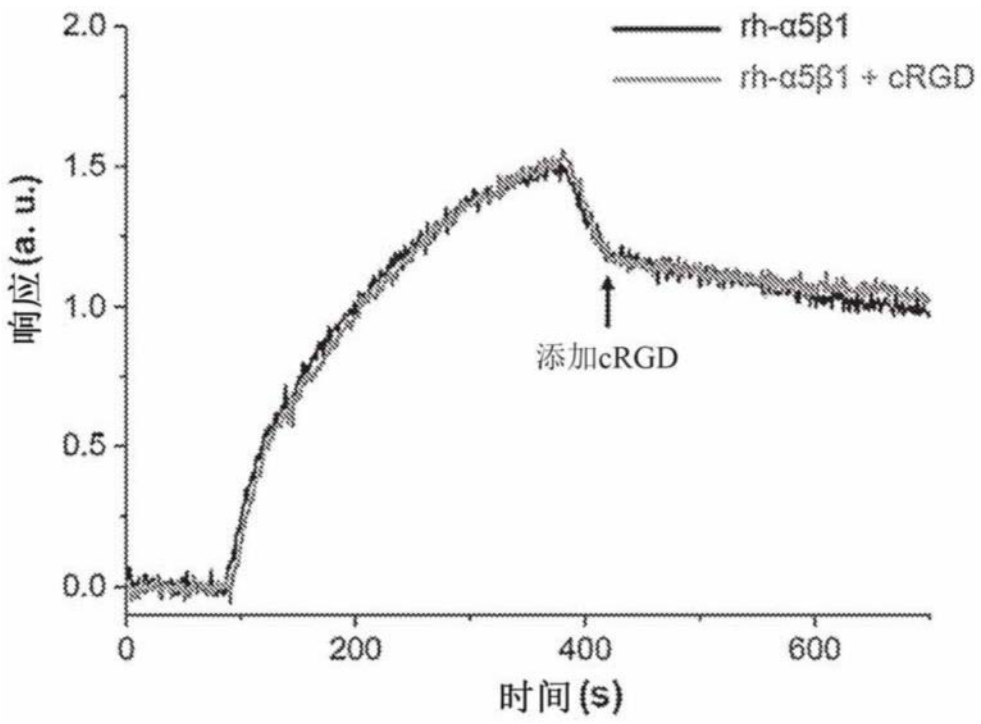


图4A(续)

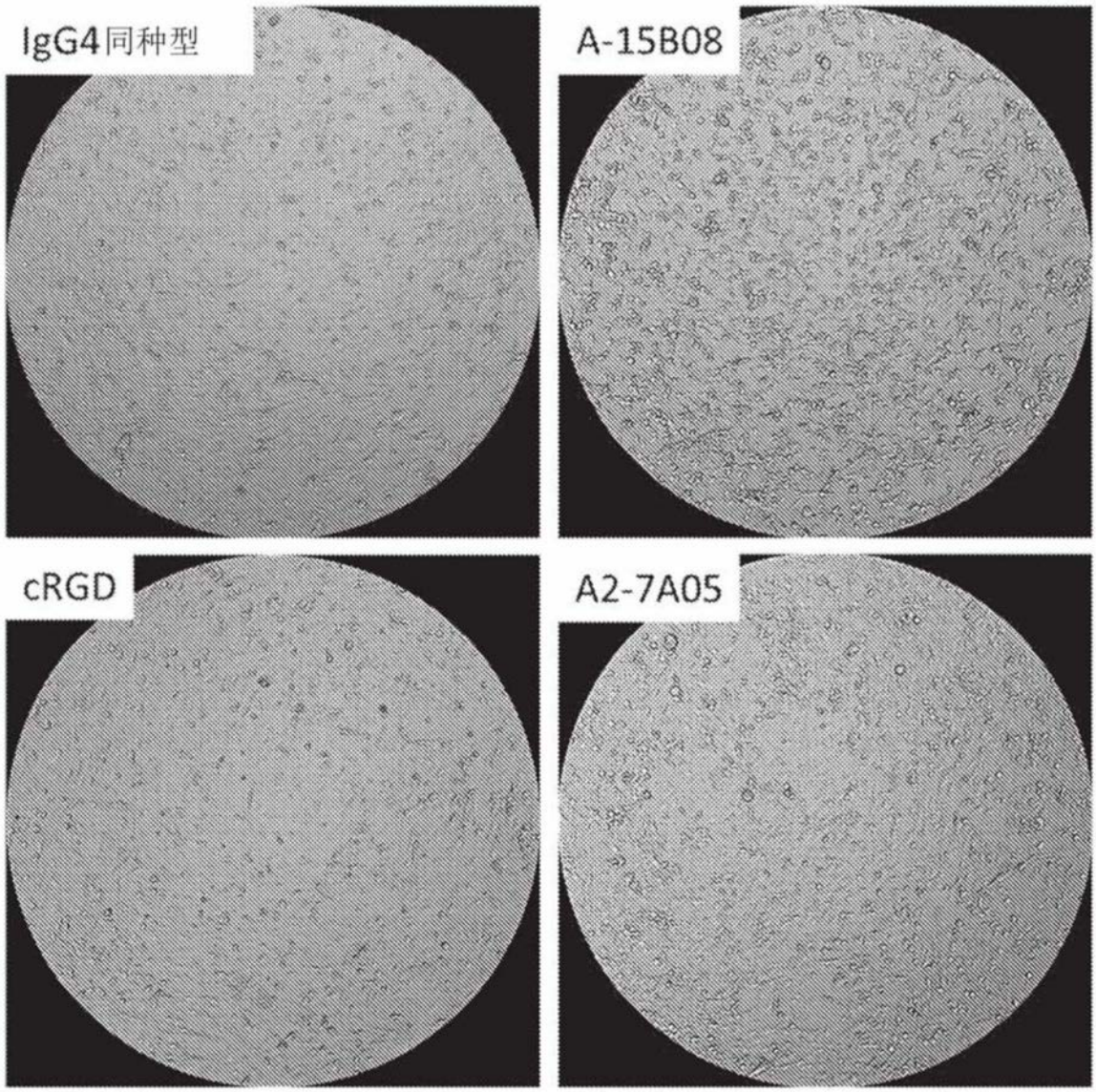


图4B

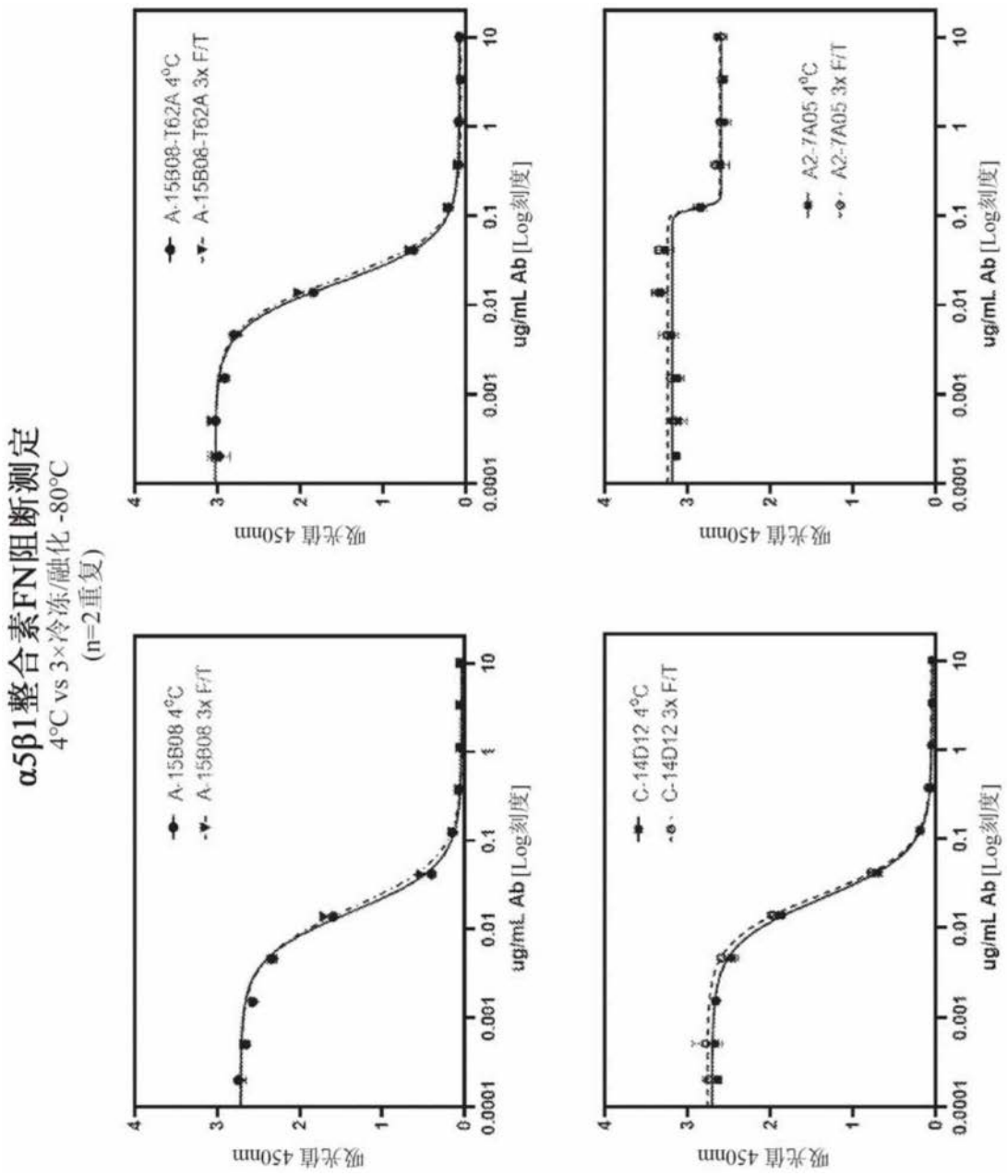

α5β1整合素FN阻断测定
4°C vs 3×冷冻/融化 -80°C
(n=2重复)
A-15B08 4°C
A-15B08 3x F/T
A-15B08-T62A 4°C
A-15B08-T62A 3x F/T
C-14D12 4°C
C-14D12 3x F/T
A2-7A05 4°C
A2-7A05 3x F/T
吸光值 450nm
ug/mL Ab [Log刻度]

图5

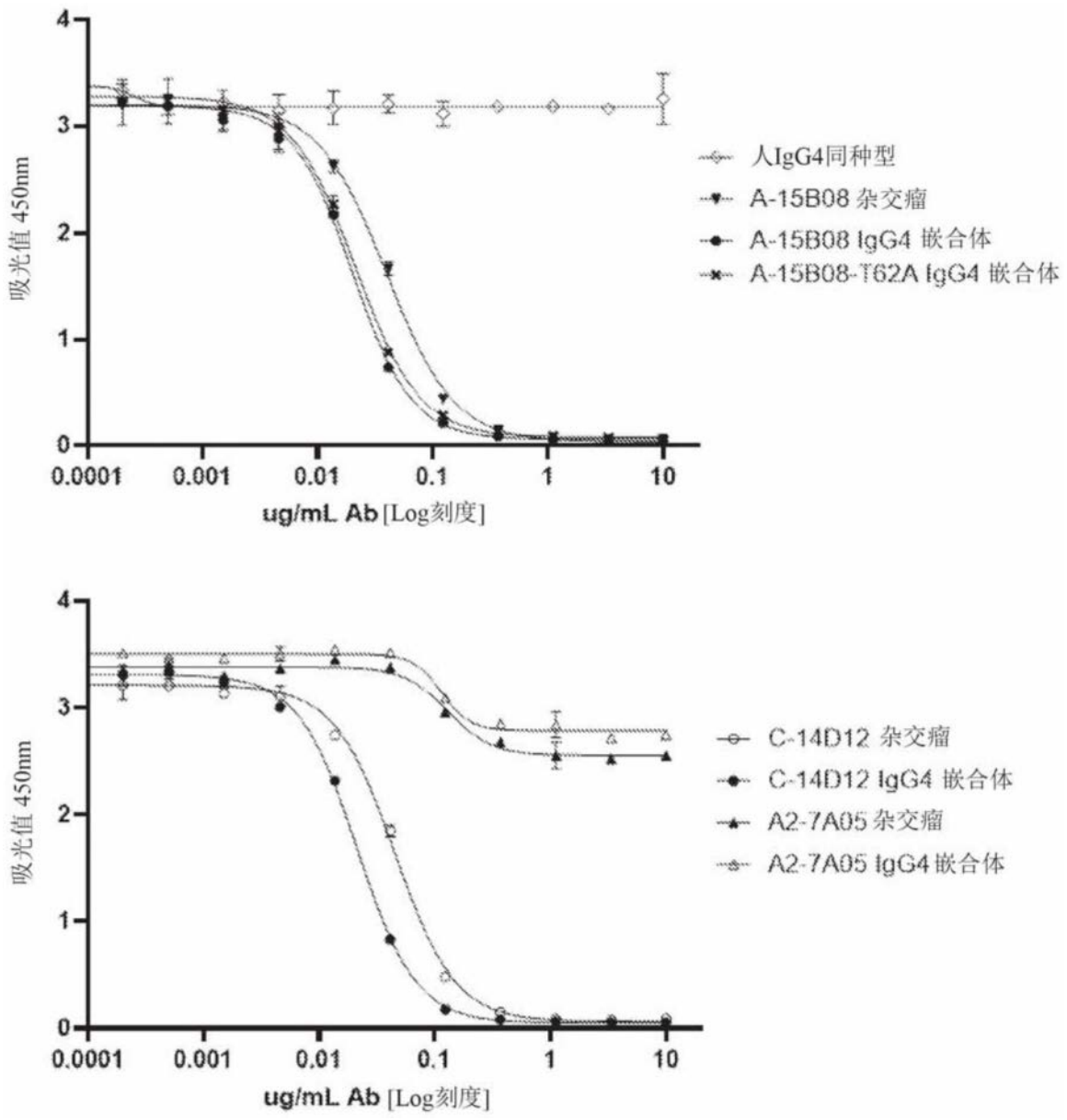

吸光值 450nm
ug/mL Ab [Log刻度]
人IgG4同种型
A-15B08 杂交瘤
A-15B08 IgG4 嵌合体
A-15B08-T62A IgG4 嵌合体
C-14D12 杂交瘤
C-14D12 IgG4 嵌合体
A2-7A05 杂交瘤
A2-7A05 IgG4 嵌合体

图6

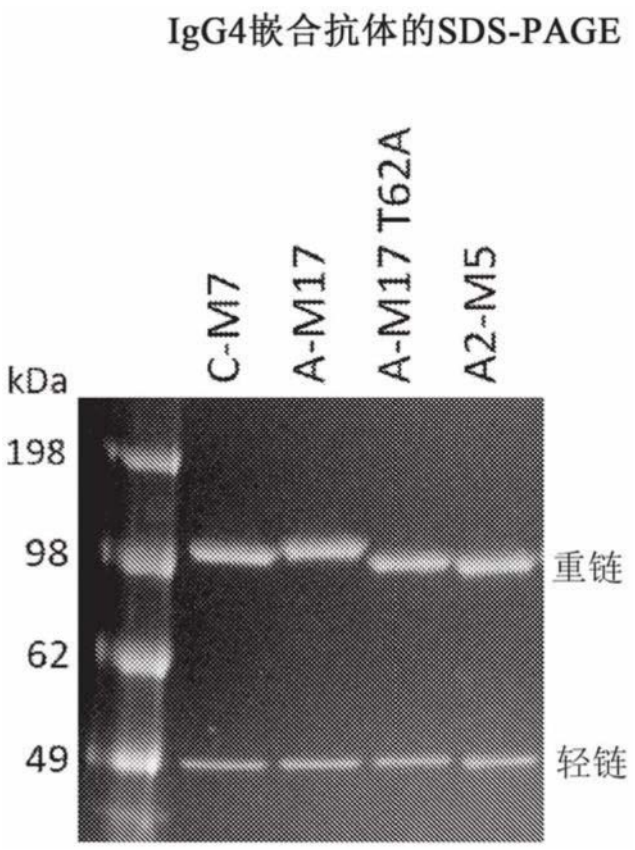

IgG4嵌合抗体的SDS-PAGE
C-M7
A-M17
A-M17 T62A
A2-M5
kDa
198
98
62
49
重链
轻链

图7

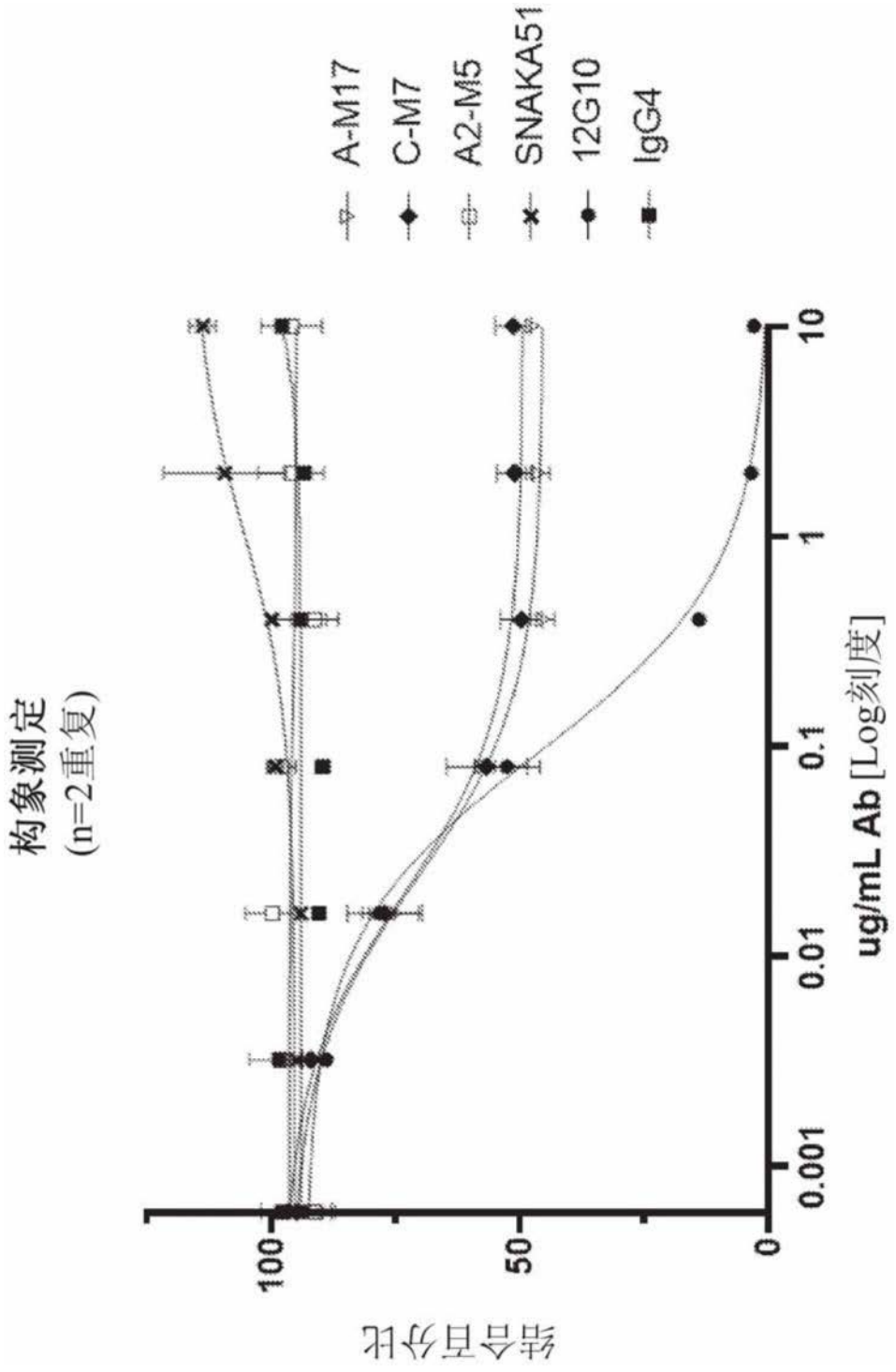

构象测定
(n=2重复)
A-M17
C-M7
A2-M5
SNAKA51
12G10
IgG4
结合百分比
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
ug/mL Ab [Log刻度]

图8

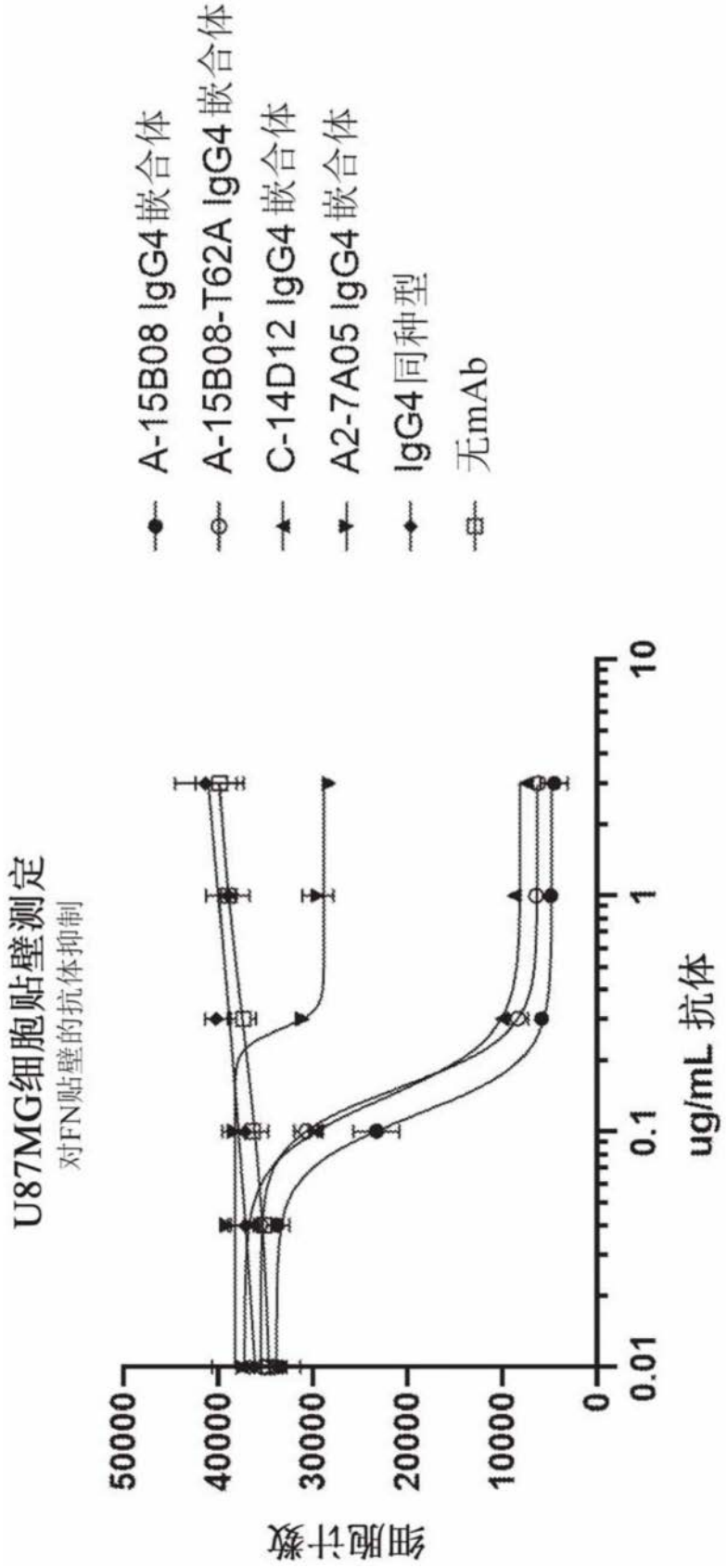

U87MG细胞贴壁测定
对FN贴壁的抗体抑制
细胞计数
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.01
0.1
1
10
ug/mL 抗体
A-15B08 IgG4 嵌合体
A-15B08-T62A IgG4 嵌合体
C-14D12 IgG4 嵌合体
A2-7A05 IgG4 嵌合体
IgG4 同种型
无mAb

图9