[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00808428.9

[45] 授权公告日 2007 年 4 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1309419C

[22] 申请日 2000.6.1 [21] 申请号 00808428.9
[30] 优先权
[32] 1999. 6. 1 [33] US [31] 60/137,038
[32] 2000. 2.29 [33] US [31] 60/185,336
[86] 国际申请 PCT/US2000/015004 2000.6.1
[87] 国际公布 WO2000/072881 英 2000.12.7
[85] 进入国家阶段日期 2001.12.3
[73] 专利权人 比奥根艾迪克 MA 公司
地址 美国马萨诸塞州
[72] 发明人 安东宁·德福格罗尔斯
菲利普·戈特瓦尔斯 罗伊·洛布
维克托·科特利安斯基
[56] 参考文献
US5788966A 1998.8.4
JP8131185A 1996.5.28
审查员 周 英
[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 巫肖南 封新琴

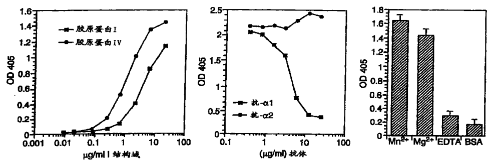
权利要求书 1 页 说明书 33 页 附图 19 页

[54] 发明名称

VLA－1 的单克隆封闭抗体及其应用

[57] 摘要

本发明公开了一种治疗炎性病症，尤其是治疗关节炎的方法。该方法包括给与一种能结合 VLA－1 的一种表位的功能性封闭抗体。



1. 一种治疗关节炎的药用组合物，其包含有效量的功能封闭性抗体或该抗体的片段以及可药用载体，其中：(1) 所述功能封闭性抗体或该抗体的片段能与极迟抗原-1 (VLA-1)的一种表位结合;（2）该表位包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸残基 91-96; 和（3）所述抗体的片段为 Fab， Fab'，F(ab')2，F(v)，重链单体或二聚体，轻链单体或二聚体，或由一条重链和一条轻链组成的二聚体。

2. 权利要求 1 的药用组合物，其中所述抗体是多克隆或单克隆抗体。

3. 权利要求 1 的药用组合物，其中所述抗体是单克隆抗体。

4. 权利要求 1 的药用组合物，其中所述抗体是人类抗体，人源化抗体或嵌合抗体。

5. 权利要求 1 的药用组合物，其中所述关节炎是类风湿性关节炎。

6. 功能封闭性抗体或该抗体的片段在制备用于治疗关节炎患者的关节炎的药用组合物中的应用，其中：(1)所述功能封闭性抗体或该抗体的片段能与极迟抗原-1 (VLA-1)的一种表位结合; (2)该表位包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸残基 91-96; 和（3）所述抗体的片段为 Fab， Fab'，F(ab')2，F(v)，重链单体或二聚体，轻链单体或二聚体，或由一条重链和一条轻链组成的二聚体。

7. 权利要求 6 的应用，其中所述抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。

8. 权利要求 6 的应用，其中所述抗体为单克隆抗体。

9. 权利要求 6 的应用，其中所述抗体是人类抗体，人源化抗体或嵌合抗体。

10. 权利要求 6-9 中任一项的应用，其中所述患者为人。

11. 权利要求 6-9 中任一项的应用，其中所述关节炎是类风湿性关节炎。

VLA-1 的单克隆封闭抗体及其应用

发明背景

整合素是细胞表面蛋白复合物，它们构成一大类能介导细胞彼此间以及与它们的周围环境之间的粘附的细胞表面分子。细胞在多种发育和生理过程中需要彼此粘附并与它们的周围环境中的其它分子粘附。实例包括组织和器官的产生以及它们的完整性的维持。这些生理过程中就包括炎性病症。

炎性过程中的关键步骤之一涉及细胞渗出血管，进入组织，和向感染部位移动。粘附分子在该过程中的作用常常被分割为一种三步骤模式，首先为白细胞在发炎的内皮上“滚动”，然后牢牢附着，使白细胞穿过内皮移动至发炎的组织(Hynes, R. O., 1992 细胞 69:11-25; Springer, T.A., 1992 细胞 76:301-314)。炎性连锁反应中的另一关键步骤，以及尚未得到深入探索的一个步骤，发生在外周组织中，在这里，浸润细胞以及固有细胞需要移动至感染部位，识别外来抗原，然后进行细胞活化以便实施它们的效应功能。为了直接评估间质粘附作用在炎症中的重要性，并与粘附作用在白细胞补充(recruitment)中的作用相区别，我们主要关注整合素家族的粘附分子和它们的片段的重要性，以及它们在炎症的动物模型，尤其关节炎模型中的作用。

发明简述

本发明提供了治疗受试者的炎性病症的方法。具体地，本发明提供了治疗关节炎的方法。

更具体地，本发明提供了治疗受试者中炎性病症的方法，该方法包括给与所述受试者一种药用组合物，其包含有效量的 α1β1 功能封闭抗体或该抗体的片段，其中所述 α1β1 功能封闭抗体或片段能与 VLA-1 上包含氨

基酸残基 91-96，即 Val-Gln-Arg-Gly-Gly-Arg 的表位结合。

抗整合素抗体可选自人类抗体、嵌合抗体、人源化抗体和它们的片段。抗整合素抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体。

本发明还提供治疗人或动物受试者的炎性病症的方法。

本发明还提供一种治疗关节炎的药用组合物，其包含有效量的功能封闭性抗体或该抗体的片段以及可药用载体，其中：(1) 所述功能封闭性抗体或该抗体的片段能与极迟抗原-1 (VLA-1)的一种表位结合；（2）该表位包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸残基 91-96；和（3）所述抗体的片段为 Fab， Fab'，F(ab')2，F(v)，重链单体或二聚体，轻链单体或二聚体，或由一条重链和一条轻链组成的二聚体。

本发明还提供功能封闭性抗体或该抗体的片段在制备用于治疗关节炎患者的关节炎的药用组合物中的应用，其中：(1)所述功能封闭性抗体或该抗体的片段能与极迟抗原-1 (VLA-1)的一种表位结合；(2)该表位包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸残基 91-96；和（3）所述抗体的片段为 Fab， Fab', F(ab')2，F(v)，重链单体或二聚体，轻链单体或二聚体，或由一条重链和一条轻链组成的二聚体。

以上部分所引用的所有文献，以及后文公开的引用文献，均在此引入作为参考。

附图说明

图 1. *活化的白细胞上的胶原蛋白结合型整合素 α1β1 和 α2β1*。(A)对 IL-2 活化型脾细胞(第 11 天)上 α1 和 α2β1 整合素表达的流式细胞仪分析。细胞用抗 α1 mAb，抗α2mAb，或非结合型对照 mAb 标记(灰线)，然后用 FITC-抗仓鼠免疫球蛋白标记。(B)抗 α1 和抗 α2 mAb 对白细胞与胶原蛋白的粘附的影响。将 10^5 个 IL-2 活化的脾细胞用所述 mAb 处理 15 分钟，然后铺板至 IV 型或 I 型胶原蛋白包被孔中，37℃1 小时。如实施例 1 所述计算粘附，表示为相对于对照 mAb 所处理细胞的粘附百分比。粘附试验一式 3 份，至少进行 3 个独立的实验。图中显示了一个代表实验。

图 2. *抗整合素 mAb 对迟发型超敏反应效应期的影响*。SRBC 致敏的小鼠腹膜内(i.p.)注射所述 mAb，1 小时后进行 SRBC 攻击。抗原攻击的 20 小时后测量足垫厚度，结果表示为如实施例 2 所述的％足垫厚度增加值±SEM。这些数据代表总共 8 个试验，其中 n=79(PBS)，68(对照仓鼠 Ig)，68(抗-α1)，29(抗-α2)，18(抗-α1 + 抗-α2)，45(抗-α4)，18(抗-α5)，20(抗-α6)，和 10(抗-β1)。所用 mAb 为：Ha4/8(对照仓鼠的第二组免疫球蛋白)，Ha31/8(抗-α1)，Ha1/29(抗-α2)，PS/2(抗-α4)，5H10-27(抗-α5)，GoH3(抗-α6)，和 HMβ1-1(抗-β1)。

图 3. *抗整合素 mAb 对接触性超敏反应效应期的影响*。FITC 致敏的小鼠腹膜内注射所述 mAb，4 小时后进行 FITC 攻击。在起点和 24 小时后测量耳的厚度，结果表示为如实施例 3 所述的％耳厚度增加值±SEM。这些数据代表总共 9 个试验，其中 n=74(PBS)，60(对照仓鼠 Ig)，26(抗-ICAM-1)，44(抗-α1)，44(抗-α2)，38(抗-α1 + 抗-α2)，36(抗-α4)，16(抗-α5)，26(抗-α4 + 抗 - α5)，24(抗 - α6)，和 22 (抗 - β1)。所用仓鼠 mAb 为：Ha4 / 8 (对

照仓鼠的第二组免疫球蛋白)，Ha31/8(抗-α1)，Ha1/29(抗-α2)，HMβ1-1(抗-β1)，3E2(抗-ICAM-1)；所用大鼠 mAb 为 R35－95 和 R35－38(分别为对照大鼠 IgG2a 和大鼠 IgG2b)，PS/2(抗-α4)，5H10-27(抗-α5)，GoH3(抗-α6)。

图 4. *α1 缺陷型小鼠与野生型小鼠中接触性超敏反应应答的比较。* FITC 致敏的小鼠腹膜内注射所述 mAb，4 小时后进行 FITC 攻击。在起点和 24 小时后测量耳的厚度，结果表示为如实施例 4 所述的%耳厚度增加值± SEM。每种情况中用到 4-5 只小鼠，所有实验都至少实施 3 次。显示其中一次代表性的实验。

图 5. *抗 α1 和抗 α2 mAb 对巴豆油诱导的非特异性炎症的影响。*小鼠腹膜内注射所述 mAb，4 小时后在耳部涂抹巴豆油。在起点和 24 小时后测量耳的厚度，结果表示为如实施例 5 所述的%耳厚度增加值± SEM。每种情况中用到 4-5 只小鼠，所有实验都至少实施 3 次。显示其中一次代表性的实验。

图 6. *抗 α1 和抗 α2 mAb 对胶原蛋白 mAb 诱导的关节炎的影响。*小鼠在第 0 天时腹膜内注射抗胶原蛋白 mAb，第 3 天注射 LPS。小鼠从第 0 天开始每 3 天腹膜内注射目标 mAb 一次。关节炎的临床症状在注射 LPS 后的 2-3 天时出现，持续数周。每隔 3 天，如实施例 6 所述分别给各肢按 0-4 级评分，结果表示为所有各肢在第 9 天至第 15 天之间的平均关节炎评分(± SEM)。这些数据代表 4 次实验的总结，其中每一实验由每种情况下的 3-4 只小鼠组成。

图 7. 给与抗 α1 或抗 α2 mAb 抑制了 DTH 应答期间白细胞向足垫中的浸润。实验如图 2 所述进行。抗原攻击的 20 小时后，切下足垫，组织切片用苏木精和伊红染色。组织切片来自未受攻击的小鼠(A)或用 SRBC 攻击后的 SRBC-致敏小鼠(B-H)。小鼠在接受攻击的 1 小时前用 PBS(B)、对照仓鼠的 Ig (C, G)、抗-α1(D)、抗-α2 (E)或抗-α1 与抗-α2 mAb 的组合(F, H)处理。放大倍数：×100 (A-F)，×400 (G-H)。

图 8. 在 DTH 应答期间，α1β1 在足垫中的浸润白细胞上表达。抗原攻击的 20 小时后，对未接受处理但已发炎的足垫中浸润的白细胞进行免疫组化染色。**(A)**直接用 Alexa488 偶联的对照 mAb 和抗 α1 mAb 染色的系列切片。**(B)**用 Alexa488 偶联的抗 α1 mAb 和藻红蛋白(PE)偶联的细胞谱系特

异性 mAb 进行的双免疫荧光染色。所用 PE 偶联的 mAb 特异性针对粒细胞/单核细胞(抗 CD11b)、中性粒细胞(抗 Ly6G/Gr-1)、和 T 淋巴细胞(抗 CD3)。放大倍数：×400。

图 9. 抗 α1 和 α2 mAb 对胶原蛋白 mAb 诱导型关节炎的影响。**(A)** 小鼠用抗 α1 或抗 α2 mAb 进行预防性处理降低了关节炎评分。小鼠在第 0 天用抗胶原蛋白 mAb 处理，然后在第 3 天用 LPS 处理。第 6 天出现关节炎并持续数周。小鼠从第 0 天开始每 3 天用目标 mAb 处理一次。每隔 3 天分别给各肢按 0-4 级评分。结果表示为所有各肢在第 9 天至第 15 天之间(最大评分为 16)的平均关节炎评分(± SEM)。每种情况下，每组使用 4 只小鼠；显示了 12 项试验的均值。**(B)** α1 缺陷型小鼠与抗 α1 mAb 处理的野生型小鼠相比，关节炎评分降低。实验细节和评分如上概述。每种情况下，每组使用 4 只小鼠；显示了 2 项试验的均值。

图 10. 抗 α1 mAb 处理对患有关节炎的关节的免疫病理的影响。抗 α1 mAb 处理减少了白细胞的浸润，细胞向关节表面的粘附，和以蛋白聚糖丢失为表现的软骨损伤。正常小鼠(A-D)或接受对照仓鼠 Ig (E-H)或抗 α1 mAb 处理(I-L)的关节炎小鼠(第 8 天)的后肢。对所述后肢拍照(A, E, I)并切下，组织切片用苏木精/伊红(B-C, F-G, J-K)或甲苯胺蓝染色以检测蛋白聚糖(D, H, L)。放大倍数：×16 (B, F, J)；×160 (C, G, K)；×200 (D, H, L)。

图 11. 关节炎的进展因淋巴细胞的缺乏而延迟，抗 α1 mAb 对关节炎的抑制作用因淋巴细胞的缺乏而发生。野生型 B6，129 或 RAG-1-缺陷型 B6，129 小鼠在第 0 天用抗胶原蛋白 mAb 处理，然后在第 3 天用 LPS 处理。第 6 天出现关节炎并持续数周。小鼠从第 0 天开始每 3 天用目标 mAb 处理。每隔 3 天分别给各肢按 0-4 级评分。结果表示为每一肢的平均关节炎评分(最大评分为 4)。每种情况下，每组使用 4 只小鼠。

图 12. 抗 α1 mAb 对关节炎的抑制作用的剂量应答。野生型 Balb/c 小鼠在第 0 天用抗胶原蛋白 mAb 处理，然后在第 3 天用 LPS 处理。第 6 天出现关节炎并持续数周。小鼠从第 0 天开始每 3 天腹膜内注射目标剂量的 Ha4/8 (同种型对照)或 Ha31/8 (抗 α1) mAb。每隔 3 天分别给各肢按 0-4 级评分。结果表示为每一肢的平均关节炎评分(最大评分为 4)。每种情况下，每组使用 4 只小鼠。

图 13. 用抗 α1 mAb 进行治疗性处理降低了关节炎评分。野生型 Balb/c

小鼠在第 0 天用抗胶原蛋白 mAb 处理，然后在第 3 天用 LPS 处理。第 6 天出现关节炎并持续数周。小鼠从第 4 天开始每 3 天腹膜内注射 mAb (250μg)或 Ig 融合蛋白(200μg)。小鼠接受 mAb (Ha4/8 同种型对照或 Ha31/8 抗 α1)，或 Ig 融合蛋白(同种型对照 Ig 或 TNF-R55-Ig)，或二者的组合(250μg Ha31/8 和 200μgTNF-R55-Ig)。每隔 3 天分别给各肢按 0-4 级评分。结果表示为每一肢的平均关节炎评分(最大评分为 4)。每种情况下，每组使用 4 只小鼠。

图 14. *定位抗α1 I 结构域封闭性 mAb 的表位。* **A.** 大鼠(上)和人(下)的 α1-I 结构域的氨基酸序列。含有 MIDAS (金属离子依赖性粘附位点)基元的残基用粗体表示。取代了相应大鼠残基的人类氨基酸(RΔH)表示在方框区内大鼠序列的下面。为表示清楚，文本部分的残基编号与该图一致。**B.** 浓度不断增加的 mAb AJH10 (ATCC 保藏号____)与包被了 30μg/ml 人类(圆形)，大鼠(三角)或 RΔH (方形)的 α1-I 结构域的平板结合。所示数据为三次实验的代表。

图 15. 图 15 描述人类 α1-I 整合素多肽序列的氨基酸序列。抗-α1-I 结构域阻断性 mAbs(SEQ ID NO:8)所识别表位的氨基酸序列显示在框中。

图 16. *α1-I 结构域的封闭性 mAb 的鉴定。* **A.** 浓度不断增加的 mAb AEF3 (三角)或 AJH10 (ATCC 保藏号____) (圆形)与包被了 30μg/ml α1-I 结构域的平板结合。**B.** α1-I 结构域用浓度不断增加的 mAb AJH10 (ATCC 保藏号____) (钻石型)或 mAb BGC5 (方形)处理，并结合至 IV 型胶原蛋白(2μg/ml)包被的平板。**C.** K562-α1 细胞用浓度不断增加的 mAb AEF3 (三角)或 AJH10 (ATCC 保藏号____) (圆形)处理，并结合至 IV 型胶原蛋白(5μg/ml)包被的平板。每孔中所加细胞的 45-50％与 IV 型胶原蛋白粘附。数据为三项独立实验的代表。

图 17. *封闭性 mAb 的物种交叉反应性。* **A.** (1)绵羊血管平滑肌、(2)人类白血病 K562-α1 细胞或(3)纯化的 RΔH GST-I 结构域; (4)大鼠 GST-α1 I 结构域; 以及(5)人类 GST-α1 I 结构域的去污剂裂解物用 10-20％SDS-PAGE 在非还原条件下分离，然后用功能封闭性 mAb AJH10 (ATCC 保藏号____)进行免疫印迹。分子量标志示于左侧; 非还原性 α1β1 整合素迁移至～180 kDa; GST-I 结构域迁移至～45 kDa。**B.** 大鼠血管平滑肌细胞与 mAb AJH10 (ATCC 保藏号____) (下)或鼠 IgG 对照(上)一起保温，然后用荧光活化细胞分拣仪(FACS)进行分析。

图 18. *α1-I 结构域与胶原蛋白结合*。**A.** 浓度增加的人类 α1-I 结构域与已包被了 1μg/ml I 型胶原蛋白(方形)或 IV 型胶原蛋白(圆形)的平板结合。所示值已用与 BSA 结合的本底校正。**B.** 2μg/ml 人类 α1-I 结构域与浓度增加的抗人 α1 整合素抗体 5E8D9 (方形)或抗人 α2 整合素抗体 A2IIE10 (圆形)混合，然后结合至已用 1μg/ml IV 型胶原蛋白包被的平板上。**C.**平板用 1μg/ml IV 型胶原蛋白或 3％BSA 包被。α1-I 结构域(2μg/ml)随后在有 1 mM Mn^{2+}，1 mM Mg^{2+}，或 5 mM EDTA 存在的情况下，与已包被的平板结合。所示数据为三项独立实验的代表。

发明详述

本发明发现，整合素抗体及其片段，尤其 α1 整合素亚单位，能封闭前炎性白细胞与细胞外基质成分，包括但不限于胶原蛋白、层粘连蛋白、和纤连蛋白的相互作用。虽然并非将本发明限制在任何单一的作用机制上，但已提出，整合素及其片段与外周基质之间相互作用的中断可能减少了前炎性细胞因子的表达。还提出，整合素抗体及其片段可能通过作用于抗原特异性 T 细胞的水平而调节炎性应答的效应期。此外，已提出整合素抗体及其片段可能通过破坏细胞在组织中的迁移和/或对组织中的细胞引发和活化产生影响而发挥作用。

这一发现阐述了整合素家族的粘附分子，尤其 α1β1，在与炎症相关的情况中在组织外环境中的重要性。它还通过强调富含基质的组织外环境对免疫应答的重要性，而将整合素家族以及它们的片段在炎症中的作用扩展至白细胞粘附和在内皮界面的外渗以外，它还揭示了外周组织可作为基于粘附的治疗的一个新介入点。

本发明的方法包括对整合素抗体的使用，其中所述整合素包括下述分子，它们含有与 α 链(包括但不限于 α1，α2，α3，α4，α5，α6，α7，α8，α9，α10，αV，αL，αM，αX，αD，αE，αIIb)非共价结合的 β 链(包括但不限于 β1，β2，β3，β4，β5，β6，β7，β8)。本发明所用各种整合素的实例包括，但不限于：

α1β1, α2β1, α3β1, α4β1, α5β1, α6β1, α7β1, α8β1, α9β1, α10 β1, αVβ1, αLβ1, αMβ1, αXβ1, αDβ1, αIIbβ1, αEβ1;

α1β2, α2β2, α3β2, α4β2, α5β2, α6β2, α7β2, α8β2, α9β2, α10 β2, αVβ2, αLβ2, αMβ2, αXβ2, αDβ2, αIIbβ2, αEβ2;

α1β3, α2β3, α3β3, α4β3, α5β3, α6β3, α7β3, α8β3, α9β3, α10 β3, αVβ3, αLβ3, αMβ3, αXβ3, αDβ3, αIIbβ3, αEβ3;

α1β4, α2β4, α3β4, α4β4, α5β4, α6β4, α7β4, α8β4, α9β4, α10 β4, αVβ4, αLβ4, αMβ4, αXβ4 αDβ4, αIIbβ4, αEβ4;

α1β5, α2β5, α3β5, α4β5, α5β5, α6β5, α7β5, α8β5, α9β5, α10 β5, αVβ5, αLβ5, αMβ5, αXβ5, αDβ5, αIIbβ5, αEβ5;

α1β6, α2β6, α3β6, α4β6, α5β6, α6β6, α7β6, α8β6, α9β6, α10 β6, αVβ6, αLβ6, αMβ6, αXβ6, αDβ6, αIIbβ6, αEβ6;

α1β7, α2β7, α3β7, α4β7, α5β7, α6β7, α7β7, α8β7, α9β7, α10 β7, αVβ7, αLβ7, αMβ7, αXβ7, αDβ7, αIIbβ7, αEβ7;

α1β8, α2β8, α3β8, α4β8, α5β8, α6β8, α7β8, α8β8, α9β8, α10 β8, αVβ8, αLβ8, αMβ8, αXβ8, αDβ8, αIIbβ8, αEβ8;

本发明的方法还包括针对整合素片段的抗体的应用，所述片段包括如单独的β链(其包括但不限于β1，β2，β3，β4，β5，β6，β7，β8)，以及单独的α链(其包括但不限于α1，α2，α3，α4，α5，α6，α7，α8，α9，α10，αV，αL，αM，αX，αD，αE，αIIb)。此外，本发明还包括针对整合素片段的抗体的应用，如针对α链的I结构域，包括但不限于α1β1 (Bresewitz 等，1993，生物学化学杂志 268:2989)；α2β1 (Takada和 Hemler，1989，细胞生物学杂志 109：397)；αLβ2 (Larson 等，1989，细胞生物学杂志 108：703)；αMβ2 (Corbi 等，1988，生物学化学杂志 263: 12403)；αXβ2 (Crobi 等，1989，EMBO J 6: 4023)；αDβ2 (Grayson

等，1988，实验医学杂志 188：2187)；αEβ7 (Shaw 等，1994，生物学化学杂志 269：6016)的 I 结构域的抗体。在一优选实施方案中，α1-I 结构域抗原决定簇包含至少 6 个连续氨基酸的序列，其中所述连续序列可在图 15 的序列中找到。而且，在一优选实施方案中，该连续序列为 Val-Gln-Arg-Gly-Gly-Arg。

产生本发明所用整合素的方法为本领域技术人员已知(参见如 Springer 等，1990，自然 346：425-434)。

本发明的实施方案还包括抗整合素多克隆和单克隆抗体。本发明优选的实施方案包括一种单克隆抗体，如抗 α1 单克隆抗体。

本文中 α1β1 功能封闭抗体指与 α1-I 结构域，具体是与图 15 的氨基酸 91-96 所确定的表位结合，并阻断 α1β1 功能的抗体。所述阻断可通过它们抑制 k562-α1 依赖性粘附至 IV 型胶原蛋白的能力来检测(见实施例 15)。

用于治疗，尤其人类治疗的优选抗体和同系物包括人类抗体同系物、人源化抗体同系物、嵌合抗体同系物、Fab、Fab’、F(ab’)2 和 F(v)抗体片段，以及抗体重链或轻链的单体或二聚体或其混合物。因此，针对整合素分子及其片段的单克隆抗体是本发明方法中的优选结合剂。

本文中术语“抗体同系物”包括由免疫球蛋白重链和轻链经二硫键连接而成的完整抗体。术语“抗体同系物”还包括含有选自下组的一或多种多肽的蛋白质，所述组包括免疫球蛋白轻链、免疫球蛋白重链及其能结合一或多种抗原(即含 α1、α2、α6 或 α-I 结构域的整合素亚单位)的抗原结合片段。由一种以上多肽组成的抗体同系物中的多肽组分可任选经二硫键连接或经其它方式共价交联。

相应地，“抗体同系物”包括完整的 IgA, IgG, IgE, IgD, IgM 型免疫球蛋白(以及它们的亚型)，其中免疫球蛋白的轻链可以为 κ 型或 λ 型。

“抗体同系物”还包括完整抗体中保留了抗原结合特异性的部分，如 Fab 片段、Fab’片段、F(ab’)2 片段、F(v)片段、重链单体或二聚体、轻链单体或二聚体、由一条重链和一条轻链组成的二聚体、等。因此，衍生自上述抗体的抗原结合片段以及全长二聚体或三聚体多肽本身均有效。

本文中“人源化抗体同系物”是通过重组 DNA 技术产生的抗体同系物，其中人类免疫球蛋白轻链或重链中非抗原结合所必需的部分或全部氨基酸被非人类哺乳动物免疫球蛋白轻链或重链的相应氨基酸取代。

本文中“嵌合抗体同系物”是通过重组 DNA 技术产生的抗体同系物，其中免疫球蛋白轻链和/或重链的铰链区和恒定区的全部或部分已被另一种免疫球蛋白的轻链或重链的相应区取代。在另一方面，本发明的特征是一种嵌合分子变体，其包括：(1)整合素靶向部分；(2)任选地，第二肽，如增加整合素靶向部分的可溶性或体内寿命的肽，如免疫球蛋白超家族成员或其片段或部分，如 IgG 的部分或片段，如人类 IgG1 重链恒定区，如 CH2 和 CH3 铰链区；以及毒素部分。嵌合分子可用于治疗对与上皮细胞如毛囊等增生相关的疾病易感的受试者，如人类。

本文中“人类抗体同系物”是通过重组 DNA 技术产生的抗体同系物，其中免疫球蛋白轻链或重链的所有氨基酸都来自人类。

本文中“炎性病症”包括，但不限于皮肤相关疾病，如牛皮癣、湿疹、烧伤和皮炎。可用本发明方法治疗的其它炎性病症包括但不限于对哮喘、支气管炎、痛经、腱炎、滑囊炎的治疗，对疼痛和头痛的治疗，或作为退热剂用于治疗发烧。本发明的方法还可用于治疗胃肠道疾病如炎性肠疾病、Crohn’s 病、胃炎、过敏性肠综合征及溃疡性结肠炎，还可用于预防结直肠癌。本发明的方法可用于治疗下述疾病中的炎症，所述病症如脉管疾病、偏头痛、结节性动脉炎、甲状腺炎、再生障碍性贫血、Hodgkin’s 病、风湿热、I 型糖尿病、重症肌无力、多发性硬化症、结节病、肾综合征、Behcet’s 综合征、多肌炎、牙龈炎、超敏反应、结膜炎、伤后肿胀、心肌缺血等。本发明的方法还可用于治疗过敏性鼻炎、呼吸窘迫综合征、内毒素休克综合征、以及动脉粥样硬化。

在优选的实施方案中，本发明的方法可用于治疗关节炎，包括例如类风湿性关节炎和骨关节炎。

“有效量”是足以实现有利或所需临床结果的量。有效量可一次或分多次给与。就治疗炎性病症而言，抗整合素抗体的“有效量”是足以减轻、改善、稳定、逆转、减缓或延迟一种炎症相关症状的进展，并达到针对所治病症或针对美容目标的临床可接受水平的量。对效力的指标的检测可用多种现有诊断方式进行，所述方式包括但不限于生理检查如验血、肺功能检查、和 X 光胸透；CT 扫描；支气管镜检；支气管肺泡灌洗；肺活检和 CT 扫描。

产生单克隆抗体，包括如抗整合素单克隆抗体的技术是已知的。如参

见Mendrick等，1995，*Lab. Invest.* 72：367-375 (鼠抗 α1β1和抗 α2β1 mAb); Sonnenberg等，1987，生物学化学杂志 262: 10376-10383 (鼠抗 α6β1 mAb); Yao等，1996，细胞科学杂志 109: 3139-50 (鼠抗 α7β1 mAb); Hemler等，1984，免疫学杂志 132：3011-8 (人 α1β1 mAb); Pischel等，1987，免疫学杂志 138：226-33 (人 α2β1 mAb); Wayner等，1988，细胞生物学杂志 107: 1881-91 (人 α3β1 mAb); Hemler等，1987，生物学化学杂志 262: 11478-85 (人 α4β1 mAb); Wayner等，1988，细胞生物学杂志 107：1881-91 (人 α5β1 mAb); Sonnenberg等，1987，生物学化学杂志 262：10376-10383 (人 α6β1 mAb); A Wang等，1996，*Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15：664-672 (人 α9β1 mAb); Davies等，1989，细胞生物学杂志 109：1817-26 (人 αVβ1 mAb); SanchezMadrid等，1982，美国国家科学院学报 79：7489-93 (人 αLβ2 mAb); Diamond等，1993，细胞生物学杂志 120：1031-43 (人 αMβ2 mAb); Stacker等，1991，免疫学杂志 146: 648-55 (人 αXβ2 mAb); Van der Vieren等，1995，免疫(*immunity*)3：683-90 (人 αDβ2 mAb); Bennett等，1983，美国国家科学院学报 80：2417-21 (人 αIIbβ3 mAb); Hessle等，1984，分化(*differentiation*) 26：49-54 (人 α6β4 mAb); Weinacker等，1994，生物学化学杂志 269：6940-8 (人 αVβ5 mAb); Weinacker等，1994，生物学化学杂志 269：6940-8 (人 αVβ6 mAb); Cerf-Bensussan等，1992，欧洲免疫学杂志 22：273-7 (人 αEβ7 mAb); Nishimura等，1994，生物学化学杂志 269：28708-15 (人 αVβ8 mAb); Bossy等，1991，*EMBO J* 10：2375-85 (人 α8β1 多克隆抗血清)；Camper 等，1998，生物学化学杂志 273：20383-20389 (人 α10β1 多克隆抗血清)。

通常，将永生化细胞系(常为骨髓瘤细胞)与已用表达指定抗原如整合素的全细胞免疫的哺乳动物的淋巴细胞(常为脾细胞)融合，筛选所得杂交瘤细胞的培养上清中针对所述抗原的抗体。主要参见Kohler等，1975，自然 265：295-497，"能分泌具有预定特异性的抗体的融合细胞的连续培养"。

免疫可用标准方法完成。单位剂量和免疫方案取决于所免疫的哺乳动物的种类、其免疫状态、该哺乳动物的体重等。通常，给免疫动物放血，用相应筛选试验分析每份血样之血清中的特定抗体。例如，抗整合素抗体可通过对整合素表达细胞的 ^{125}I-标记的细胞裂解物进行免疫沉淀来鉴定。抗体，包括如抗整合素抗体，还可通过流式细胞仪鉴定，如通过测量抗体表

达细胞与被认为能识别整合素分子的抗体一起保温后的荧光染色来鉴定。用于产生杂交瘤细胞的淋巴细胞通常分离自已免疫且已用这类筛选试验证实其血清含有整合素抗体的哺乳动物。

通常，所述永生化细胞系(如骨髓瘤细胞系)来自与淋巴细胞相同的哺乳动物物种。优选的永生化细胞系为敏感于含有次黄嘌呤、氨基喋呤和胸腺嘧啶的培养基(“HAT”培养基)的小鼠骨髓瘤细胞系。通常，将 HAT 敏感型小鼠骨髓瘤细胞与小鼠脾细胞用分子量 1500 的聚乙二醇(PEG 1500)融合。然后用 HAT 培养基筛选该融合所得杂交瘤细胞，在所述培养基中，未融合和生长特性不相符的骨髓瘤细胞被杀死(未融合的脾细胞 7 天后由于不能转化而死亡)。能产生所需抗体的杂交瘤通过筛选杂交瘤培养上清来检测。例如，为产生抗整合素抗体而制备的杂交瘤，可通过检验杂交瘤培养上清中分泌抗体的结合重组整合素表达细胞系的能力来进行筛选。

为了产生完整免疫球蛋白形式的抗体同系物，包括如抗整合素抗体同系物，可将上述筛选中检验为阳性的杂交瘤细胞在营养培养基中于适当条件下培养足够长的时间，以使所述杂交瘤细胞将单克隆抗体分泌至培养基中。适用于杂交瘤细胞的组织培养技术和培养基是已知的。可收集经调整的杂交瘤培养上清，并可任选用已知方法进一步纯化抗整合素抗体。

或者，可通过将杂交瘤细胞注射至未免疫小鼠的腹腔中来产生所需抗体。杂交瘤细胞在腹腔中增殖，分泌抗体并积累在腹水中。可用注射器从腹腔中抽取腹水，从而收获抗体。

针对例如整合素的纯人类单克隆抗体同系物是本发明方法中另一种可阻断抗原的优选结合剂。在它们的完整形式中，它们可用体外引发的人类脾细胞制备，如 Boerner 等，1991，免疫学杂志 147：86-95，“由体外引发的人类脾细胞产生抗原特异性人类单克隆抗体”所述。

或者，它们可通过如 Persson 等，1991，美国国家科学院学报 88：2432-2436，“通过对所有组成成分的克隆产生各种高亲和力人类单克隆抗体”，以及 Huang 和 Stollar，1991，免疫学方法杂志 141：227-236，“不经体外刺激而从人类外周血淋巴细胞构建代表性的免疫球蛋白可变区 cDNA 文库”所述的对所有组成成分的克隆来制备。美国专利 5,798,230 (1998 年 8 月 25 日，“制备人类单克隆抗体的方法及其应用”)描述了从人类 B 细胞制备人类单克隆抗体。根据该方法，能产生抗体的人类 B 细胞通过 Epstein-Barr

病毒或其能表达 Epstein-Barr 病毒核抗原 2(EBNA2)的衍生物感染而永生化。EBNA2 功能(是永生化所必需的)随后关闭，导致抗体产生的增加。

在另一产生纯人类抗体的方法中，美国专利 5,789,650 (1998 年 8 月 4 日，“产生异源抗体的非人类转基因动物”)描述了能产生异源抗体的非人类转基因动物和具有灭活的内源性免疫球蛋白基因的非人类转基因动物。内源性免疫球蛋白基因通过反义多核苷酸和/或通过针对内源性免疫球蛋白的抗血清来抑制。异源抗体由该种非人类动物的基因组中通常不具有的免疫球蛋白基因编码。将含有非重排型异源人类免疫球蛋白重链序列的一或多种转基因导入非人类动物，从而产生转基因动物，该动物能功能性重排转基因免疫球蛋白序列，并产生由人类免疫球蛋白基因编码的各种同种型抗体的所有组成成分。这些异源人类抗体在 B 细胞中产生，然后 B 细胞通过与永生化细胞系如骨髓瘤融合而永生化，或通过用其它技术操作这些 B 细胞而制备一种能产生单克隆异源性纯人类抗体同系物的永生化细胞系。

另一种能在本发明方法中封闭整合素抗原或其片段的优选结合剂是能与整合素蛋白或其片段结合的人源化抗体同系物。在制备嵌合抗体的早期方法之后，EP 0239400 (Winter 等)描述了一种新方法，其中通过将一种抗体的互补决定区(CDR)用另一种的相应区代替而改变抗体。该方法可用于，例如将人类重链和轻链 Ig 可变区结构域的 CDR 用来自鼠的可变区结构域的另一种 CDR 取代。随后使这些已改变的 Ig 可变区与人的 Ig 恒定区组合，产生除取代的鼠 CDR 以外，完全由人的成分组成的抗体。预计这些 CDR-取代型抗体相对于嵌合抗体较不易于激发人类的免疫应答，因为 CDR-取代型抗体只含有很少量的非人类成分。经由 CDR “移植” 而产生人源化单克隆抗体的方法被称为 “整形(reshaping)” (Riechmann 等，1988，自然 332: 323-327，“对人类抗体进行整形以用于治疗”；Verhoeyen 等，1988，科学 239: 1534-1536，“应用单克隆抗体中的 CDR 移植使人类抗体整形”)。

通常，将鼠的抗体的互补决定区(CDR)移植在人类抗体中相应区上，因为所述 CDR(抗体重链上 3 个，轻链上 3 个)是小鼠抗体上的特异性抗原结合区。可通过基因工程移植 CDR，其中 CDR DNA 序列通过克隆鼠重链和轻链可变区(V 区)基因片段来测定，然后通过定点诱变转移至相应人的恒定区。在该方法的最后阶段，添加具有所需同种型的人类恒定区基因片段(通常为 CH 的 γ I 型和 CL 的 κ 型)，使人源化重链和轻链基因在哺乳动物细

胞中共表达，以产生可溶性人源化抗体。

向人的抗体转移这些 CDR 使该抗体具备了来源鼠抗体的抗原结合特性。鼠抗体上的 6 个 CDR 安装在 V 区的“框架区”上。CDR-移植成功的原因是，小鼠与人的抗体框架区可能具有非常相似的三维结构，且具有相似的 CDR 附着点，使得 CDR 可以互相交换。这类人源化抗体同系物可通过如 Jones 等，1986，自然 321：522-525，“用小鼠抗体的互补决定区替代人类抗体中的相应区”；Riechmann，1988，自然 332：323-327，“对人类抗体进行整形以用于治疗”；Queen 等，1989，美国国家科学院学报 86：10029，“与白细胞介素 2 受体结合的人源化抗体”和 Orlandi 等，1989，美国国家科学院学报 86：3833，“通过聚合酶链反应克隆免疫球蛋白可变区以便表达”。

尽管如此，框架区中某些氨基酸被认为可与 CDR 反应并影响整个抗原结合亲和力。直接从鼠抗体转移 CDR 来产生人源化抗体，而不对人的 V 区框架作任何修饰，常常导致结合亲和力的部分或完全丧失。在多个例子中，改变受体抗体的框架区中的残基对获得结合活性似乎是关键的。

Queen 等，1989，美国国家科学院学报 86：10029-10033，“与白细胞介素 2 受体结合的人源化抗体”和 WO90/07861 (Protein Design Labs Inc.)已描述，通过使鼠 mAb(抗-Tac)的 CDR 与人的免疫球蛋白框架区及恒定区组合可制备在受体抗体的框架区中包含修饰的残基的人源化抗体。他们已证实了不修饰人的 V 区框架残基而直接转移 CDR 常导致的亲和力丢失问题的一种解决方法；其包括两个关键步骤。第一，用计算机分析与来源鼠抗体(此例中为抗-Tac MAb)V 区框架具有最佳同源性的蛋白序列，由此选择人的 V 框架区。第二步，利用计算机作出该鼠 V 区的三级结构模型，以便观察框架中最可能与鼠 CDR 作用的氨基酸残基，然后将这些鼠氨基酸残基重叠在人的同源框架上。他们这种利用带假定鼠接触残基之人类同源框架的方法可获得具有与来源鼠抗体相似的结合亲和力的人源化抗体，如白细胞介素 2 受体特异性抗体(Queen 等，1989，出处同上)，以及疱疹病毒(HSV)特异性抗体(Co 等，1991，美国国家科学院学报 88：2869-2873，“用于抗病毒治疗的人源化抗体”)。

根据以上在 WO 90/07861 中所述的两步法，Queen 等总结了设计人源化免疫球蛋白的几个关键。第一个关键是，用通常同源于将被人源化的非

人类供体免疫球蛋白的特定人类免疫球蛋白的框架作为人类受体，或用来自多种人类抗体的框架作为共有框架。第二个关键是，如果人类受体的残基是不常见的，而框架中特异性残基处的供体残基是人类序列中常见的，则优选用供体氨基酸而不是受体氨基酸。第三个关键是，在紧邻CDR的位点使用供体框架的氨基酸残基而不用受体的。

也可用另一种方法(参见Tempest，1991，生物技术9：266-271，“对人类单克隆抗体进行整形以抑制人类呼吸道合胞病毒的体内感染”)，和作为标准，利用分别衍生自NEWM和REI重链和轻链的V区框架在不随机导入小鼠残基的情况下进行CDR移植。利用Tempest等，1991的方法构建基于NEWM和REI的人源化抗体，其优势是，NEWM和REI可变区的三维结构已通过X线晶体成像分析得知，并因此可构建CDR与V区框架残基的特异性相互作用的模型。

本发明的处理方法对具有这些情况的人类和动物受试者均有效。可应用本发明的动物受试者包括作为宠物驯养或为商业目的驯养的动物和牲畜。实例如狗、猫、牛、马、绵羊、猪和山羊。

本发明方法中，抗体(包括如抗VLA-1抗体)可通过非胃肠道途径给药。本文中“非胃肠道”包括皮下、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、损伤内和颅内注射或灌注技术。

本发明的药用组合物包括本发明的任何化合物，或其可药用的衍生物，以及任何可药用的载体。本文中“载体”包括已知的可接受的佐剂和载体。

根据本发明，药用组合物可以为无菌注射制剂，如无菌可注射的水性或油性悬浮液。这种悬浮液可根据本领域已知技术利用适当分散剂或湿润剂和悬浮剂来配制。

本发明的药用组合物可口服。如果口服，可为口服能接受的任何剂型，包括但不限于胶囊、片剂、含水悬浮液或溶液。

局部应用时，可将药用组合物配制为适当的膏剂，其中含有悬浮于或溶解于一或多种载体中的活性成分。

本发明的药用组合物还可通过气溶胶形式鼻内给药，或通过喷雾器、干粉吸入器或计量型药剂吸入器的使用而吸入给药。

本发明化合物能有效产生所需效应的剂量和用药频率取决于多种因

素，如抑制剂的特性、受试者的个体大小、治疗所要达到的目标、所治疗的病理特性、所用的具体药用组合物、以及施治医生的判断。活性成分化合物每日剂量在约 0.001-约 100 mg/kg 体重时有效，优选约 0.1-约 50 mg/kg 体重/天。最优选抗体同系物以约 0.1-约 20 mg/kg 体重/天，优选约 0.1-约 10 mg/kg 体重/天的剂量每隔 1－14 天给药一次。在另一优选实施方案中，抗体以约 0.3- 1 mg/kg 体重腹膜内(I.P.)给药。在另一优选实施方案中，抗体以约 5-12.5 mg/kg 体重静脉内(I.V.)给药。优选给与有效量的抗体组合物以便能提供至少 1μg/ml 的血浆抗体水平。

本领域技术人员可轻易检验本发明的拮抗剂是否具有所需效应。例如，可利用能检测所给试剂的第二试剂来体外(或离体)检测患者上皮样品中所含细胞是否含有所述试剂。该第二试剂可以是，例如荧光染料标记的特异性针对所给试剂的抗体，其然后可以用标准 FACS(荧光活化的细胞分拣术)分析来测量。或者，可通过患者细胞不能与被标记(如被荧光染料标记)的所给试剂结合或结合能力降低来体外(或离体)检测所给试剂的存在。优选的剂量应能使绝大多数刺猬状阳性细胞产生可检测的包被。优选当使用抗体同系物时所述包被可维持 1-14 天。

除非另外指明，本发明的实施可利用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、微生物学、重组 DNA、蛋白质化学、和免疫学的常规技术，它们均落在本领域技术人员的范围内。这些技术文献中有述。例如，参见，**分子克隆：实验室手册**，第二版(Sambrook, Fritsch 和 Maniatis 编)，冷泉港实验室出版社，1989；**DNA 克隆**，第 I 和 II 卷(D.N. Glover 编)，1985；**寡核苷酸合成**(M.J.Gait 编)，1984；美国专利 4683195 号(Mullis 等)；**核酸杂交**(B.D. Hames 和 S.J. Higgins 编)，1984；转录和翻译(B.D. Hames 和 S.J. Higgins 编)，1984；**动物细胞的培养**(R.I. Freshney 编)，Alan R. Liss, Inc.，1987；**固相化细胞和酶**，IRL 出版社，1986；**分子克隆实用指南**(B. Perbal)，1984；**酶学方法**，第 154 和 155 卷(Wu 等编)，学院出版社(Acedemic Press)，纽约；**用于哺乳动物细胞的基因转移载体**(J.H. Miller 和 M.P. Calos 编)，1987，冷泉港实验室；**细胞和分子生物学中的免疫化学方法**(Mayer 和 Walker 编)，学院出版社，伦敦，1987；**实验免疫学手册**，第 I-IV 卷(D.M. Weir 和 C.C. Blackwell 编)，1986；**小鼠胚的操作**，冷泉港实验室出版社，1986。

以下实施例旨在举例说明本发明，不应理解为对本发明的限制。

实施例

化学试剂

异硫氰酸荧光素(FITC)购自 Sigma 化学公司(St. Louis, MO)。巴豆油购自 ICN Biochemicals (Aurora, OH)。Alsevers 溶液中的全羊血获自 East Acres Biologicals (Southbridge, MA)。I 型大鼠尾部胶原蛋白和 IV 型小鼠胶原蛋白分别购自 Collaborative Research Inc. (Bedford, MA)和 Gibco (Gaithersburg, MD)。

6-8 周龄的 Balb/c 雌性小鼠购自 Taconic (Germantown, NY),基于 Balb/c 背景的 α1β1 整合素缺陷型小鼠如前述(3)。

实施例 1

单克隆抗体。制备不含叠氮钠且只含少量内毒素的针对鼠抗原的功能封闭性 mAb: Ha31/8 (仓鼠抗-CD49a; 整合素 α1)(Mendrick 等，1995，Lab. Invest. 72:367-375)，Ha1/29 (仓鼠抗-CD49b; 整合素 α2)(β1)(Mendrick 等，1995，Lab. Invest. 72:367-375; Mendrick D.L.和 D.M. Kelly，1993，Lab. Invest. 69:690-702)，仓鼠 II 组对照 mAb Ha4/8 (仓鼠抗-KLH)(Mendrick D.L.和 D.M. Kelly，1993，Lab. Invest. 69:690-702)，和 PS/2 (大鼠抗-CD49d; 整合素 α4β1 链)(Miyake 等，1991，J. Exp. Med.173:599-607)。此外，以下针对鼠抗原的功能封闭性 mAb 是作为无叠氮钠/低内毒素毒性制剂购自 Pharmingen (San Diego, CA): HMβ1-1 (仓鼠抗-CD29; 整合素 β1 链)(Noto 等，1995，Int. Immunol. 7:835-842)，Ha2/5 (仓鼠抗-CD29; 整合素 β1 链) (Mendrick D.L. 和 D.M. Kelly，1993，Lab. Invest. 69:690-702)，3E2 (仓鼠抗-CD54，ICAM-1) (Scheynius 等，1993，免疫学杂志 150:655-663)，5H10-27 (大鼠抗-CD49e; 整合素 α5)(Kinashi, T.和 T.A. Springer，1994，血细胞 20:25-44)，GoH3 (大鼠抗-CD49f; 整合素 α6)(Sonnenberg 等，1987，生物学化学杂志 262: 10376-10383)，和大鼠同种型对照 mAb R35-95 (大鼠 IgG2a)和 R35-38 (大鼠 IgG2b)。

粘附试验。将 Balb/c 小鼠脾细胞用 20 ng/ml IL-2 培养 7-12 天。细胞对 I 型和 IV 型胶原蛋白的粘附如前所述(Gotwals 等，1996，临床研究杂志，97:2469-2477)。简短说，96 孔 Maxisorp 板(Nunc, Napierville, IL)用 10μg/ml IV 型胶原蛋白或 5μg/ml I 型胶原蛋白包被，非特异性位点用 1%BSA 封

闭。IL-2 活化的脾细胞用 2μM BCECF [2',7'-双(羧乙基)-5(6)羧基荧光素五乙酰氧甲基酯](Molecular Probes, Eugene, OR)标记，并与 10μg/ml 所选 mAb 一起保温 15 分钟。然后在包被孔中加入 10^5 细胞的 0.25%BSA-RPMI 溶液，37℃保温 60 分钟。未结合的细胞通过用 0.25%BSA-RPMI 洗涤 3 次而除去。粘附用 CytoFluor 2350 荧光读板仪(Millipore, Bedford, MA)定量。测定已结合的细胞与所输入细胞的总数之比，并计算相对于用对照 mAb 处理的细胞(设定为 100%标准)的粘附百分率。减去仅用 BSA 包被的孔中细胞粘附的本底值。

*α1β1 和 α2β1 在活化白细胞上的表达以及功能封闭。*由于白细胞在炎症中所起的关键作用，我们决定检验抗 α1 mAb 和抗 α2 mAb 是否能封闭白细胞对胶原蛋白的粘附。为了获得对 α1 和 α2 都能高水平表达的白细胞，将小鼠 T 细胞用 IL-2 体外刺激 7-12 天。这些细胞高水平表达 α1 和 α2(图 1A)，并与 IV 型和 I 型胶原蛋白包被的表面很好地结合(图 1B)。对 IV 型胶原蛋白的粘附在单用抗 α1 mAb 时被部分抑制，单用抗 α2 mAb 时不受抑制。相反，对 I 型胶原蛋白的粘附被抗 α2 mAb 完全抑制，单用抗 α1 mAb 时仅显示部分抑制。抗 β1 mAb 以及抗 α1 和 α2 mAb 的组合可完全抑制对 I 型和 IV 型胶原蛋白的粘附。在证实 α1β1 和 α2β1 整合素表达于活化 T 细胞上，和抗 α1 和 α2 mAb 能功能性封闭白细胞对胶原蛋白的粘附之后，我们使用这些 mAb 来研究所述整合素在炎性病症的动物模型中的体内作用。

实施例 2

*用抗整合素 mAb 抑制 DTH 应答。*利用此前已公开的方案(Hurtrel 等，1992，细胞免疫学 142: 252-263)获得 SRBC-诱导的迟发型超敏反应(DTH)应答。简短说，小鼠于第 0 天背部皮下(s.c.)接种 2×10^7 SRBC 的 100μl PBS 溶液。第 5 天于右后足垫皮下注射 1×10^8 SRBC 的 25μl PBS 溶液对小鼠进行攻击。抗原攻击的 20 小时后用工程卡尺(Mitutoyo/MTI, Paramus, NJ)测量足垫的厚度，并计算足垫肿胀的程度。结果表示为足垫厚度的平均增长百分率± SEM，计算公式是%增长 = [1-(抗原攻击的 20 小时后右足垫的厚度/抗原攻击的 20 小时后未处理的左足垫的厚度)] × 100。为了阻断 SRBC-诱导的 DTH 应答的效应期，在第 5 天于抗原攻击的 1 小时前，腹膜内(i.p.)给与用实施例 1 所述方法制备的治疗性 mAb 或对照 mAb (100μg)。

SRBC-诱导的 DTH 是一种明确定性的炎症(尤其牛皮癣)的体内模型，其已用于证实各种细胞因子和粘附分子在炎症中的重要性(Tedder 等，1995，实验医学杂志 181：2259-2264，Terashita 等，1996，免疫学杂志 156：4638-4643)。SRBC-敏感型小鼠在足垫抗原攻击的 1 小时前接受抗整合素 mAb，20 小时后通过测量增加的足垫厚度来评估炎症。PBS 处理的小鼠和对照仓鼠 Ig 处理的小鼠显示，抗原攻击的 20 小时后足垫厚度增加 60-70％(图 2)。与对照仓鼠 Ig 的处理相比，抗 α1 mAb 或抗 α2 mAb 分别导致对足垫厚度的 68％和 60％抑制。抗 α1 和 α2 mAb 的组合导致 71％抑制，证实相比于单用抗 α1 mAb 或抗 α2 mAb 几乎没有加成效应。用其它抗整合素 mAb 进行处理也能有效抑制 DTH 效应应答。用各种 mAb 处理显示的抑制程度为 49％(抗 α4)，23％(抗 α5)和 57％(抗 α6)。最后，能封闭共有 β1 整合素亚单位的 mAb (mAb HMBI-1)使效应物 DTH 应答被抑制 67％。

实施例 3

用抗整合素 mAb 抑制 CHS 效应物应答。如前述(Gaspari 等，1991，在《免疫学最新方法》，J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach，和 W. Strober 编，John Wiley & Sons，纽约。4.2:1 节)评估对 FITC 的接触性超敏反应(CHS)。简短说，小鼠于第 0 天在已去毛的背部涂抹 0.5％FITC 的 1:1 丙酮/二丁基邻苯二甲酸酯溶液 100μl，使小鼠致敏。10 天后，通过在每只耳的双侧应用 5μl 0.5％FITC 来攻击小鼠。于抗原攻击时(第 10 天)和 24 小时后，用工程卡尺(Mitutoyo/MTI, Paramus, NJ)测量耳的厚度以确定耳肿胀应答，结果表示为基线耳厚度的平均增长百分率± SEM，耳厚度的增加的计算公式是％增长＝[1-(抗原攻击的 24 小时后耳的厚度/抗原攻击时耳的厚度)]×100。为了阻断 CHS 应答效应期，在第 10 天于抗原攻击的 4 小时前，腹膜内给与治疗性 mAb 或对照 mAb (250μg)。经抗原致敏且仅用载体攻击耳部的小鼠(载体对照)或耳部未经事先致敏而接受攻击的小鼠(刺激剂对照)用作阴性对照(耳部厚度的增加从未超过 2％)。

由于 CHS 具有与 DTH 不同的机制并涉及不同的效应细胞，我们研究了抗整合素 mAb 对 CHS 应答效应期有何影响。在小鼠已去毛的背部应用 FITC，使小鼠被半抗原致敏，10 天后用 FITC 攻击耳部导致在第二天发生炎性应答。FITC 致敏小鼠经证实在抗原攻击的 24 小时后厚度增加 60-70％(图 3)。与已公开的结果(Scheynius 等，免疫学杂志，150：655-663)一致，

抗 ICAM-1 mAb 处理导致耳部肿胀被抑制 51%。与对照仓鼠 mAb 相比，小鼠在抗原攻击的 4 小时前用抗 α1 或抗 α2 mAb 处理导致耳部肿胀分别被抑制 37%和 57%(图 3)。抗 α1 和抗 α2 mAb 的组合导致对耳部肿胀的稍强抑制作用(65%)。用针对 β1 整合素的其它 mAb 进行的处理表明，虽然抗 α4 和抗 α5 mAb 与对照大鼠 mAb 相比，对 FITC 诱导的 CHS 效应物应答无抑制作用，但用抗 α6 mAb 处理导致对效应物应答的 86%抑制。最后，能封闭共有 β1 整合素亚单位的 mAb 使 CHS 效应物应答被抑制 74%。用不同小鼠品系(C57/BL6, 129/Sv)和另一种致敏剂(噁唑酮)得到类似的 CHS 结果(数据未显示)。与在 SRBC-诱导的 DTH 模型中所见结果相似，对发炎的耳朵的组织学分析表明，水肿形成和白细胞浸润均被抗 α1 和抗 α2 mAb 的处理抑制。

与 α1β1 和 α2β1 可在 IL-2 活化的脾细胞上表达的发现一致，对抗原致敏小鼠(FITC 或噁唑酮)的淋巴结的分析表明，α1β1 和 α2β1 仅在 $CD44^{hi}$ $LFA\text{-}1^{hi}$ 活化的 CD4+和 CD8+ T 细胞上表达(数据未显示)。用抗 α1 和抗 α2 mAb 处理小鼠未导致这些细胞的删除，表现为 CHS 模型中应答抗原致敏的脾脏和淋巴结中活化 T 细胞数未受影响。此外，效应细胞未出现功能性缺失，因为抗 α1 和抗 α2 mAb 对抗原致敏型小鼠的延长处理(10-16 天)未能影响第 20 天时小鼠对抗原攻击的炎性应答(数据未显示)。

实施例 4

CHS 效应应答在 α1β1 缺陷型小鼠中减少。α1β1 在 FITC 介导型 CHS 之效应应答中的抑制作用可能由 mAb 介导，为排除这种可能性，在野生型小鼠和 α1β1 整合素缺陷型小鼠中进行实验(图 4)。野生型小鼠中效应期的 MAb 抑制作用与此前的结果一致，用抗 α1 可导致耳部厚度被抑制 56%，用抗 α2 为 56%，用抗 α1 和抗 α2 的组合为 62%。未处理的 α1β1 缺陷型小鼠与未处理的野生型小鼠相比，CHS 效应期显著减弱(耳部厚度分别增加 30%和 71%)。如所预计，未处理的 α1β1 缺陷型小鼠耳部肿胀的水平等价于抗 α1 mAb 处理的野生型小鼠中的耳部肿胀水平。最后，能封闭 α2β1 的 mAb 在 α1β1 缺陷型小鼠中仅导致对耳部肿胀的略微增加的抑制作用，其与在接受抗 α1 和抗 α2 mAb 组合的处理的野生型小鼠中所见一致。

实施例 5

DTH和CHS炎症模型中所见的抗整合素mAb的抑制效应可能由抗α1和抗α2 mAb介导的总抗炎效应所致，为进一步排除这种可能性，研究了这些mAb在刺激性皮炎中的效应。

为评估刺激性皮炎，在小鼠的每只耳朵的双侧涂抹0.8%巴豆油的丙酮溶液5μl。在应用该刺激剂的4小时之前给与治疗性抗体或对照抗体。24小时后如上述测量耳部肿胀，并与应用巴豆油之前的耳部厚度比较。结果表示为如上所述的基线耳部厚度的平均增长百分率± SEM。仅涂抹了丙酮的小鼠(载体对照)作为阴性对照。

24小时后，用巴豆油处理的小鼠当与仅接受载体(丙酮)的小鼠相比时显示耳部厚度的显著增加(48%)。用抗α1或抗α2 mAb预处理的小鼠与PBS处理鼠或对照mAb处理鼠相比，巴豆油所致毒性耳部肿胀未受显著影响(图5)。对巴豆油处理的耳的组织学检查表明，用抗α1或抗α2 mAb处理的小鼠与对照mAb处理鼠或PBS处理鼠相比，浸润细胞的数量或类型或水肿的形成没有差异(数据未显示)。

实施例6

α1β1和α2β1对关节炎的抑制。由于α1β1在关节炎患者滑膜中的浸润细胞上良好表达，我们决定检查抗α1或抗α2 mAb是否在前述关节炎加速模型(Terato等，1992，免疫学杂志148：2103-2108；Terato等，1995，自身免疫22：137-147)中具有抑制作用。

Arthrogen-CIA抗体试剂盒购自Stratagene (La Jolla, CA)，关节炎用现有成熟技术(Terato等，1992，免疫学杂志148：2103-2108；Terato等，1995，自身免疫22：137-147)诱导。简短说，关节炎通过第0天腹膜内(i.p.)注射4种抗II型胶原蛋白mAb (各1mg)的混合物，然后于第3天腹膜内注射50μg LPS来诱导。在随后的3-4天中，小鼠腕关节、踝关节和趾逐渐肿胀。于第0天注射抗胶原蛋白mAb的4小时前，腹膜内给与治疗性mAb或对照mAb (250μg)，在第3天给与LPS的4小时前，再次给与相同制剂，然后在整个实验期间以3天的间隔持续给药。从第3天开始，评估小鼠的关节炎进展。对每一肢的关节炎严重程度用一个四点系统评分：0 = 正常；1 = 轻度红肿，踝关节或腕关节的轻微肿胀；2 = 踝关节或腕关节的中度肿胀；3 = 包括部分趾、踝关节以及足部的严重肿胀；4 = 最严重的红肿。

Balb/c小鼠中，严重的关节炎在LPS注射的72小时后出现并持续3周

以上。仅注射抗胶原蛋白 mAb 或仅注射 LPS 都未诱导关节炎。接受对照 mAb 处理的小鼠与用 PBS 处理的小鼠显示相同严重程度的关节炎(图 6)。相比之下，单用抗 α1 mAb 处理导致关节炎显著减轻(78%)并持续实验全程。单用抗 α2 mAb 处理也出现有利效果，导致关节炎评分比对照 mAb 处理鼠的评分降低 32%。抗 α1 和抗 α2 mAb 的组合导致与单用抗 α1 mAb 所得相似程度的抑制作用。

实施例 7

*抗 α1 和抗 α2 mAb 处理对炎性细胞浸润的效应的组织学分析。*对 SRBC-诱导的 DTH 应答的进一步组织学分析证实了抗 α1 和抗 α2 mAb 处理对所激发的炎性应答的调节能力(图 7)。SRBC-致敏小鼠的未受攻击的足垫(图 7A)当与同一小鼠的 SRBC-攻击的足垫(图 7B)相比时，未显示任何炎性细胞浸润。抗 α1 和抗 α2 mAb 分别或组合所处理的 SRBC-致敏小鼠，当与对照 mAb 处理的小鼠相比时，在 SRBC 攻击的足垫中找到的这些浸润细胞的数量大大减少(图 7C-F)。对浸润细胞的仔细检查表明，大多数细胞为中性粒细胞，还有部分单核细胞和淋巴细胞，还证实抗 α1 和抗 α2 mAb 处理大大减少了这些细胞的数量(图 7G-H)。

实施例 8

*对炎性细胞浸润中 α1 表达细胞的免疫组化测定。*实施免疫组化以便更精确测定浸润细胞的特征以及它们是否表达能与胶原蛋白结合的整合素(图 8)。检查未处理小鼠的发炎足垫中的浸润细胞是否表达 α1β1 整合素和细胞谱系标志物(图 8)。发现 α1β1 整合素在多种浸润白细胞上表达(图 8A)。用双免疫组化鉴定浸润细胞的特性以及 α1β1 表达的分布(图 8B)。利用细胞谱系标志物发现浸润物中绝大部分为粒细胞/单核细胞(Mac-1+)，其中很多为中性粒细胞(Gr1+)，还有少数 T 淋巴细胞(CD3+)(图 8B)。发现 α1β1 整合素在所有三种细胞亚型中表达，其中 α1 表达于 Mac-1+粒细胞/单核细胞亚型，Gr1+中性粒细胞亚型，以及绝大多数浸润的 CD3+ T 淋巴细胞上(图 8B)。详细地免疫组化分析表明，尽管抗 α1 和抗 α2 mAb 处理减少了浸润细胞的数量，但浸润物的细胞组成未变(数据未显示)。用 FITC 抗仓鼠 mAb 进行的免疫组化染色证实，抗 α1 和抗 α2 mAb 能定位于发炎的足垫中(数据未显示)。

实施例 9

抗 α1β1 mAb 和抗 α1β2 mAb 对关节炎的抑制以及在 α1 缺陷型小鼠中对关节炎的抑制。由于 α1β1 在关节炎患者滑膜中的浸润细胞上良好表达，我们决定检查抗 α1 或抗 α2 mAb 是否在前述关节炎加速模型(Terato 等，1992，免疫学杂志 148：2103-2108；Terato 等，1995，自身免疫 22：137-147)中具有抑制作用。该模型涉及给小鼠注射抗 II 型胶原蛋白 mAb 的混合物，然后给与 LPS，导致随后 3-7 天中关节炎的进展。小鼠从第 0 天每隔 3 天给与 mAb，并以 3 天的间隔评估关节炎进展。严重的关节炎在 LPS 注射的 72 小时后在所有小鼠中出现并持续 3 周以上。仅注射抗胶原蛋白 mAb 或仅注射 LPS 都未诱导关节炎。接受对照 mAb 处理的小鼠与用 PBS 处理的小鼠显示相同严重程度的关节炎(图 9A)。相比之下，单用抗 α1 mAb 处理导致关节炎显著减轻(79％或更高)并持续实验全程。单用抗 α2 mAb 处理也出现有利效果，导致关节炎评分比对照 mAb 处理鼠的评分降低 37％。抗 α1 和抗 α2 mAb 的组合导致与单用抗 α1 mAb 所得相似程度的抑制作用。所有小鼠用抗 α1 mAb 处理都导致关节炎评分的下降，比用其它数种基于 mAb 的关节炎处理效果好，所述其它 mAb 如可溶性 TNF 受体 Ig 融合蛋白(Mori 等，1996，免疫学杂志，157：3178-3182)、抗-Mac-1(Taylor 等，1996，免疫学 88：315-321)、抗 α4 (Seiffge，1996，风湿病学杂志(J. Rheumatol.)23：2086-2091)、和抗-ICAM-1 (Kakimoto 等，1992，细胞免疫学 142：326-337)(图 9A)。与显示 α1β1 在关节炎中重要性的基于 mAb 的数据一致，未处理的 α1 缺陷型小鼠当与野生型小鼠比较时显示关节炎评分的显著降低(图 9B)。

实施例 10

抗 α1 mAb 处理对患关节炎之关节的免疫学的影响。接受对照 mAb 或抗 α1 mAb 处理的野生型关节炎小鼠(第 8 天)的关节与正常未处理小鼠的关节经目测比较并进行组织学比较(图 10)。根据目测结果，对照 mAb 处理鼠显示整个足部包括脚趾红肿，而抗 α1 mAb 处理鼠即使在任一关节或脚趾有任何炎症，其症状也很轻微。组织学检查显示，对照 mAb 处理的关节炎关节有重大改变，滑膜下(subsynovial)组织有炎性细胞的广泛浸润，关节表面有细胞粘附，并有以蛋白聚糖损失为表现的显著软骨破坏(图 10)。与此前的报道(Terato 等，1992，免疫学杂志 148：2103-2108；Terato 等，1995，自身免疫 22：137-147)一致，该模型中的绝大多数浸润细胞为中性粒细胞。

小鼠经抗 α1 mAb处理大大减少了炎性浸润物的量以及软骨破坏的程度(图10)。

实施例 11

*关节炎的发生因缺乏淋巴细胞而被延迟，抗 α1 mAb 对关节炎的抑制在缺乏淋巴细胞的情况下发生。*为测定哪种细胞类型可能在胶原蛋白 mAb 诱导型关节炎模型中很重要，我们比较了野生型 B6-129 小鼠和 RAG-1-缺陷型 B6-129 小鼠发生关节炎的能力(图 11)。RAG-1 (重组活化基因-1)基因的遗传缺失导致成熟 T 和 B 淋巴细胞的完全丢失(Mombaerts 等，1992，细胞 68：869-877)。野生型小鼠和 RAG-1-缺陷型小鼠均发生关节炎，但在 RAG-1-缺陷型小鼠中诱导动力学显著减慢(图 11)。这些结果提示，尽管淋巴细胞与这种关节炎模型相关，但它们并非该疾病的发生和进展所必需。已公开的关于检查RAG-1-缺陷型小鼠在其它关节炎模型中的效应的报道也发现，T 和 B 淋巴细胞的丢失推迟了关节炎的发生(Plows 等，1999，免疫学杂志 162：1018-1023)。用抗 α1 mAb 处理野生型小鼠或 RAG-1-缺陷型小鼠彻底抑制了关节炎(图 11)。这些结果证实，抗 α1 mAb 在该模型中的效应并不依赖于淋巴细胞的存在，而且正如此前的实验(图 9)所提示，抗 α1 mAb 在预防疾病方面的效应可能是通过它对表达 α1 的其它细胞，如巨噬细胞和中性粒细胞的作用而实现。

实施例 12

*抗 α1 mAb 对关节炎的剂量依赖性抑制。*由于抗 α1 mAb 处理在预防关节炎方面的惊人效果，我们进一步将研究深入至剂量应答分析(图 12)。从第 0 天开始每 3 天腹膜内给与不同剂量的 mAb。与较早的数据一致，250 μg 抗 α1 mAb 导致几乎完全阻止关节炎。低至 100 μg 的抗 α1 mAb 在抑制该模型的关节炎方面仅部分有效，更低的剂量对关节炎评分无任何可辨别的影响(图 12)。

实施例 13

*用抗 α1 mAb 治疗可降低关节炎评分。*由于抗 α1 mAb 在预防关节炎中的效应，我们尝试对正在发展疾病的小鼠进行治疗。通过在第 0 天给小鼠注射抗II型胶原蛋白 mAb 的混合物，然后在第 3 天给与 LPS 而诱导关节炎。然后用抗 α1 mAb 或可溶性 TNF 受体 Ig 融合蛋白从第 4 天开始治疗小鼠。在于第 4 天开始接受抗 α1 mAb 的小鼠体内，当与自第 4 天开始接受

对照仓鼠 mAb 的小鼠相比时，关节炎的进展被彻底阻断(图 13)。抗 α1 mAb 治疗性给药所见抑制程度很彻底，且与抗 α1 mAb 预防性给药(自第 0 天始)所见水平相同(图 13)。相比之下，自第 4 天开始的 TNF 受体 Ig 融合蛋白的治疗与对照 Ig 融合蛋白相比仅导致对关节炎评分的 60-70％抑制(图 13)。抗 α1 mAb 和 TNF 受体 Ig 融合蛋白的联合处理能彻底抑制关节炎评分，由于抗 α1 mAb 单独处理对关节炎的彻底抑制效应，这并不奇怪。总之，这些结果表明，抗 α1 mAb 的治疗性处理可有效抑制关节炎评分，比 TNF 拮抗剂的治疗性处理效果好。

实施例 14

α1-I 结构域的克隆和诱变。从全长 cDNA (Kern 等(1994)生物学化学杂志 269，22811-22816; Ignatius 等(1990)细胞生物学杂志 111，709-720)经聚合酶链反应(PCR)(PCR CORE 试剂盒; Boehringer Mannheim 公司，德国)扩增人和大鼠 α1β1 整合素结构域 I 的序列，所用人特异性引物为 5’-CAGGATCCGTCAGCCCCACATTTCAA-3’ [正向]; 5’-TCCTCGAGGGCTTGCAGGGCAAATAT-3’ [反向]，大鼠特异性引物为 5’-CAGGATCCGTCAGTCCTACATTTCAA-3’ [正向]; 5’-TCCTCGAGCGCTTCCAAAGCGAATAT-3’ [反向]。将所得 PCR 扩增产物纯化，连接至 pGEX4t-i (Pharmacia)，转化至感受态 DH5α 细胞(Life Technologies)中。筛选氨苄青霉素抗性菌落中～45 kDa 谷胱甘肽 S-转移酶-结构域 I 融合蛋白的表达。选出用于进一步鉴定的克隆的质粒 DNA 中插入子的序列通过 DNA 测序证实。

制备大鼠/人嵌合 α1-I 结构域(RΔH)(MORPH 诱变试剂盒; 5 引物－3 引物)，将大鼠的残基 G92、R93、Q94 和 L97(图 14)分别替换为人的相应残基 V、Q、R、和 R。携有 RΔH 结构域 I 的克隆通过诊断性 Stu 1 限制酶位点的丢失而鉴定，插入子通过 DNA 测序证实。人的 α1-I 结构域的氨基酸序列示于图 15。

实施例 15

α1-I 结构域特异性 mAb 的产生。已证实单克隆抗体在研究整合素亚单位的结构和功能关系时是非常有效的探针。例如，mAb 已广泛用于研究 β1 亚单位中与活化构象相关的区域(Qu,A.和 Leahy,D.J.(1996)结构 4，931-942)。因此，为鉴定可用于 α1-I 结构域构象变化的潜在探针，我们制备了针对人的 α1-I 结构域的一组 mAb。

抗α1-I结构域单克隆抗体的产生。雌性Robertsonian小鼠(Jackson Labs)用经完全弗氏佐剂(Life Technologies)乳化的25μg纯化人型α1β1腹膜内免疫(Edwards等(1995)生物学化学杂志270，12635-12640)。经腹膜内给与以不完全弗氏佐剂(Life Technologies)乳化的25μg α1β1而加强免疫3次。显示了最高抗α1-I结构域滴度的小鼠在融合前腹膜内给与100μg α1β1而加强免疫一次，并在融合的前一天静脉给与50μg α1β1。使脾细胞与FL653骨髓瘤细胞以1:6的比例融合，并以100,000和33,000/孔铺板于96孔组织培养板中。

通过单色FACS评估上清结合α1β1整合素的能力。在FACS分析之前，使上清与未转染的K562细胞一起保温以便去除仅与β亚单位结合的IgG。随后，将悬浮于FACS缓冲液(1%胎牛血清(FCS)的PBS，含0.5%NaN_3)中的、用α1整合素亚单位转染的3-5×10^4 K562细胞(K562-α1)与上清一起于4℃保温45分钟，洗涤后，与偶联至藻红蛋白的抗小鼠IgG一起保温。细胞用FACS缓冲液洗涤两次后，在Becton Dickinson流式细胞仪上分析。

筛选所得杂交瘤上清结合α1-I结构域的能力。简短说，96孔板(Nunc)每孔加入30μg/ml人型α1-I结构域-GST融合蛋白的PBS溶液50μl，4℃包被过夜。平板用PBS洗涤，用1%BSA-PBS封闭，将杂交瘤上清与结构域I室温保温1小时。用含0.03%吐温20的PBS充分洗涤后，加入碱性磷酸酶偶联的抗小鼠IgG (Jackson ImmunoResearch)反应1小时。末次洗涤后，加入1mg/ml对硝基苯磷酸(ρNPP)在0.1 M甘氨酸、1 mM $ZnCl_2$、和1 mM $MgCl_2$中的溶液室温静置30分钟，然后读取平板的O.D.405。

检测所选上清在抑制K562-α1依赖性对IV型胶原蛋白的粘附中的能力。将K562-α1细胞用含0.25%BSA的DMEM中的2 mM 2’,7’-(双-2-羧乙基-5和6)羧基荧光素五乙酰氧甲基酯(BCECF；Molecular Probers)37℃标记30分钟。已标记的细胞用结合缓冲液(10 mM Hepes, pH 7.4；0.9% NaCl；和2%葡萄糖)洗涤，再重悬于添加了5 mM $MgCl_2$的结合缓冲液中，终浓度为1×10^6个细胞/ml。将50μl上清与等体积的2×10^5K562-α1细胞在96孔板的各孔中一起保温。然后将平板离心，除去上清。将细胞重悬于结合缓冲液中，转移至胶原蛋白包被板的孔中，37℃保温1小时。保温后，通过用结合缓冲液洗3次而除去未粘附的细胞。粘附的细胞在Cytofluor (Millipore)上分析。

我们最初鉴定了 19 个杂交瘤，它们的上清可与表达 α1β1 整合素的人类白血病 K562 细胞(K562-α1)结合并与 α1-I 结构域结合。分别从这些杂交瘤纯化免疫球蛋白，并检验它们封闭 K562-α1 或 α1-I 结构域与 IV 型胶原蛋白结合的能力。这些 mAb 可分为两类：能封闭 α1β1 功能的和不能封闭 α1β1 功能的。例如，克隆 AEF3、BGC5 和 AJH10 产生的 mAb 与 α1-I 结构域结合(图 16A，BGC5 的数据未显示)，但仅有 AJH10 可抑制 α1-I 结构域依赖性 IV 型胶原蛋白粘附(图 16B)或 K562-α1 对 IV 型胶原蛋白的粘附(图 16C)。

对互补决定区的测序。为确立该组 mAb 的克隆起源，我们通过 PCR 扩增了 12-19 种抗体的 CDR 并进行了测序(数据未显示)。

将分离自 10^7 个杂交瘤(FastTrack mRNA 分离试剂盒，Invitrogen)的 2μg mRNA 用以下引物各 25pM 进行逆转录(Ready-To-Go You Prime First Strand Kit, Pharmacia Biotech)：重链 VH1FOR-2 (Michishita 等(1993)细胞 72，857-867)；轻链，VK4FOR，其限定 4 种不同寡聚物(Kern 等(1994)生物学化学杂志 269，22811-22816)。对每种杂交瘤而言，重链和轻链在分别 4 次 PCR 反应中用以下寡聚物的各种组合来扩增：1)重链：VH1FR1K (Kamata 等(1995)生物学化学杂志 270，12531-12535)、VH1BACK、VH1BACK (Baldwin 等(1998)结构 6，923-935)、$V_H$fr1a、$V_H$fr1b、$V_H$fr1e、$V_H$fr1f、$V_H$fr1g(Ignatius 等(1990)细胞生物学杂志 111，709-720)、或 VH1FOR-2 (Michishita,M.，Videm,V.，和 Arnaout,M.A.(1993)细胞 72，857-867)；2)轻链：VK1BACK (Baldwin 等(1998)结构 6，923-935)、VK4FOR、VK2BACK 寡聚物(Kern 等(1994)生物学化学杂志 269，22811-22816)、或 $V_K$fr1a、$V_H$fr1c、$V_H$fr1e、$V_H$fr1f (Ignatius 等(1990)细胞生物学杂志 111，709-720)。对产物进行扩增(95℃5 分钟，然后以 94℃1 分钟、55℃2 分钟、72℃2 分钟进行 50 轮，最后 72℃ 10 分钟)，凝胶纯化(QIAquick, Qiagen)，然后直接用所列各种寡聚物在 ABI 377 测序仪上测序。

产生功能封闭性 mAb 的克隆的序列在所有互补决定区(CDR)和间隔框架区中几乎都相同，表明这些杂交瘤是克隆相关的。

实施例 16

免疫印迹和 FACS 分析。非封闭性抗体的可变区序列显著不同于封闭抗体中发现的克隆相关家族的序列。由于封闭抗体似乎起源于一个克隆，我

们选择一个(AJH10)进行进一步鉴定。

免疫印迹。切自绵羊主动脉的平滑肌细胞层，以及K562-α1细胞用在50 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM 苯甲基磺酰氟(PMSF)，20μg/ml抑蛋白酶肽，10μg/ml亮抑蛋白酶肽，10 mM 乙二胺四乙酸(EDTA)中的1%Triton-X100提取。样品在4-20%梯度胶上进行SDS-PAGE，然后电转移至硝酸纤维素膜上。印迹用TBS中的5%干奶粉封闭；用含0.03%吐温20的TBS洗涤，然后与抗体在含0.05%NaN_3的封闭缓冲液中保温2小时。然后如前述洗涤印迹膜，使之与辣根过氧化物酶偶联的抗小鼠IgG一起保温1小时，再次洗涤，然后用ECL试剂(Amersham)处理。再使印迹膜于胶片(Kodak)上曝光30-60秒，然后显色。

免疫印迹(图17A)和FACS分析(图17B)证实，AJH10与人、家兔和绵羊的α1β1整合素反应，但不与大鼠的α1β1整合素反应，提示封闭性mAb与进化保守的线性表位结合。非封闭性mAb在免疫印迹中无反应，也不与除人类以外的其它物种反应。

实施例17

α1-I结构域对胶原蛋白的结合为二价阴离子依赖型

A. α1-I结构域的纯化

α1-I结构域在大肠杆菌中表达为GST(谷胱甘肽-S-转移酶)融合蛋白，其在序列连接处含有凝血酶切割位点。细胞在PBS中裂解后，将澄清的上清上样至已用PBS充分洗涤过的谷胱甘肽Sepharose 4B层析柱(Pharmacia)。α1-I结构域-GST融合蛋白用50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM谷胱甘肽(还原型)洗脱。在变性研究中，结构域I用50 mM Tris, pH 7.5中的凝血酶裂解，并从GST融合配对物上纯化出来。添加DTT至2 mM，将样品上样至谷胱甘肽Sepharose 4B层析柱。将流通级分和洗涤级分汇总，上样至Q Sepharose FF柱(Pharmacia)。α1-I结构域用50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM 2-巯基乙醇，75 mM NaCl洗脱。纯化的结构域I通过电喷射电离质谱分析(ESI-MS)来展示其预定质量(Lee等(1995)结构3，1333-1340，871 Da)，其在SDS-PAGE上作为一条带迁移，该蛋白在Superose 6 FPLC柱(Pharmacia)上的大小排阻层析中以相应大小的单个峰形式洗脱。

B. 功能分析

96孔板用1μg/ml IV型胶原蛋白(Sigma)或I型胶原蛋白(Collaborative

Biomedical) 4℃包被过夜，用 Triton 缓冲液(0.1 % Triton X-100; 1 mM $MnCl_2$; 25 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl)洗柱，用 25 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl (TBS)中的 3 % 牛血清清蛋白(BSA)封闭。将在含 1 mM $MnCl_2$ 和 3 % BSA 的 TBS 中系列稀释的 α1-I 结构域-GST 融合蛋白在所述包被板上室温保温 1 小时，用 Triton 缓冲液洗涤。所结合的 α1-I 结构域用以下试剂检测：10μg/ml 生物素化抗 GST 多克隆抗体(Pharmacia)的系列稀释液；在含 1 mM $MnCl_2$ 和 3 % BSA 的 TBS 中 1:3000 稀释的 ExtrAvidin 辣根过氧化酶(Sigma)，和 1-步 ABTS (2,2'-连氮-双[3-乙基苯并噻唑啉磺酸]; Pierce)。将平板置于微滴板读板仪(Molecular Devices)上读取 O.D.405。

结果。

人和大鼠(95 % 与人的相同)的 α1-I 结构域在大肠杆菌中以 GST 融合蛋白的形式表达，并通过谷胱甘肽 Sepharose 纯化。用前述基于 ELISA 的试验(Qu, A.,和 Leahy, D.J.(1995)美国国家科学院学报 92，10277-10281)的改良试验检查这两种蛋白与 I 和 IV 型胶原蛋白结合的能力。人的 α1-I 结构域结合 IV 型胶原蛋白的效力优于结合 I 型胶原蛋白的效力(图 18A)。α1-I 结构域特异性抗体可消除针对这两种配体的结合(有关 I 型胶原蛋白的数据未显示)，但 α2-I 结构域特异性抗体不行(图 18B)。Mn^{2+}和 Mg^{2+}均可刺激结合，而 EDTA 将结合降低至本底水平(图 18C)。在人和大鼠的 α1-I 结构域之间未检测到配体结合的可测量的差异，提示物种间序列的差异并不与功能相关(数据未显示)。因此，α1-I 结构域特别需要阳离子来进行有效配体结合。

实施例 18

*MIDAS 基元附近的阳离子依赖性表位残基。*我们利用了以下现象：AJH10 识别人的 α1-I 结构域序列，因此可定位针对 α1β1 功能封闭性 mAb 的表位，但它不能识别大鼠的 α1-I 结构域序列。人和大鼠的序列仅相差 12 个氨基酸，其中 4 个位于与 MIDAS 基元内的关键性苏氨酸(图 14A，aa98)相邻的 6 个氨基酸(aa91-96，图 14A)中。为了检验以下假说，即所述 6 个氨基酸 Val-Gln-Arg-Gly-Gly-Arg 包含用于封闭 mAb 的表位，我们构建了一个嵌合结构域 I (RΔH)，其中将大鼠残基 G92、R93、Q94 和 L97 分别替换为人的相应残基 V、Q、R 和 R。AJH10，以及所有功能封闭性 mAb 可识别该嵌合结构域 I (RΔH; 图 14B)。

为了在 α1 - I 结构域的三级结构中参照 MIDAS 结构域将这些残基定

向，我们用 α2-I 结构域的晶体结构坐标构建了 α1-I 结构域的模型。

用人类 α2-I 结构域的 X 线晶体结构(Ward 等(1989)自然 341，544-546)建立人类 α1-I 结构域的相似模型。该模型用 Insight II 的相似模型构建模块(homology modeling module of Insight II)(2.3.5 版，Biosym Technologies)来构建。使用 CHARMM 程序(Clackson 等(1991)自然 352，624-628)，其中用到全氢原子参数组 22 和两倍于原子间距的距离依赖性介电常数。我们首先对 α1-I 结构域的所有原子用 1 kcal/(mol Å^2)质量-权重谐波定位约束(mass-weighted harmonic positional constraints)进行 1000 步的陡降极小化(steepest descent minimization)。该极小化后，再对 α1-I 结构域的 C-α 原子以 0.1 kcal/(mol Å^2)的约束进行 1000 步的陡降和 5000 步的 Adopted-Basis Newton Raphson，以避免与 α2-I 结构域 X 线晶体结构的显著偏差。

α1β1 和 α2β1 整合素序列显示 51％的同一性，且不含插入或缺失，提示两种 I 结构域的总体结构相似。预计金属配位(coordination)位点在 α1-I 结构域和 α2-I 结构域中相同，包含对应于封闭性 mAb 的表位的残基位于螺旋 α3 和螺旋 α4 之间的一个环中，其包含在 MIDAS 基元内的、对于阳离子结合关键性的苏氨酸。α1-I 结构域模型预测出：Q92 上的酰胺氮原子(图 14A)与 S32 的相邻残基 I33 上的羧基形成氢键。因此，包含所述表位的环可能在稳定 MIDAS 区域方面起作用。

尽管本发明已通过举例说明和用于明确理解目的的实施例在一定程度上进行了详细说明，但本领域技术人员显而易见的是，可在实践中进行特定的改变和修饰。因此，这些说明和实施例都不应理解为限制本发明的范围，该范围应由所附权利要求书来限定。

序列表

<110> 比奥根公司(Biogen, Inc.)

<120> VLA-1的单克隆封闭抗体及其在炎性疾病的治疗中的应用

<130> A076PCT

<140> PCT/US00/15004
<141> 2000-06-01

<150> 60/185336
<151> 2000-02-29

<150> 60/137038
<151> 1999-06-01

<160> 9

<170> 用于Windows 4.0的FastSEQ

<210> 1
<211> 26
<212> DNA
<213> 人(Homo Sapiens)

<400> 1
caggatccgt cagccccaca tttcaa 26

<210> 2
<211> 26
<212> DNA
<213> 人(Homo Sapiens)

<400> 2
tcctcgaggg cttgcagggc aaatat 26

<210> 3
<211> 26
<212> DNA
<213> 大鼠

<400> 3

caggatccgt cagtcctaca tttcaa 26

<210> 4
<211> 26
<212> DNA
<213> 大鼠

<400> 4
tcctcgagcg cttccaaagc gaatat 26

<210> 5
<211> 212
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 5
Val Ser Pro Thr Phe Gln Val Val Asn Ser Phe Ala Pro Val Gln Glu
1 5 10 15
Cys Ser Thr Gln Leu Asp Ile Val Ile Val Leu Asp Gly Ser Asn Ser
20 25 30
Ile Tyr Pro Trp Glu Ser Val Ile Ala Phe Leu Asn Asp Leu Leu Lys
35 40 45
Arg Met Asp Ile Gly Pro Lys Gln Thr Gln Val Gly Ile Val Gln Tyr
50 55 60
Gly Glu Asn Val Thr His Glu Phe Asn Leu Asn Lys Tyr Ser Ser Thr
65 70 75 80
Glu Glu Val Leu Val Ala Ala Lys Lys Ile Gly Arg Gln Gly Gly Leu
85 90 95
Gln Thr Met Thr Ala Leu Gly Ile Asp Thr Ala Arg Lys Glu Ala Phe
100 105 110
Thr Glu Arg Ala Arg Arg Gly Val Lys Lys Val Met Val Ile Val Thr
115 120 125
Asp Gly Glu Ser His Asp Asn Tyr Arg Leu Lys Gln Val Ile Gln Asp
130 135 140
Cys Glu Asp Glu Asn Ile Gln Arg Phe Ser Ile Ala Ile Leu Gly His
145 150 155 160
Tyr Asn Arg Gly Asn Leu Ser Thr Glu Lys Phe Val Glu Glu Ile Lys
165 170 175
Ser Ile Ala Ser Glu Pro Thr Glu Lys His Phe Phe Asn Val Ser Asp
180 185 190
Glu Leu Ala Leu Val Thr Ile Val Lys Ala Leu Gly Glu Arg Ile Phe
195 200 205
Ala Leu Glu Ala
210

<210> 6
<211> 212
<212> PRT
<213> 人(Homo Sapiens)

<400> 6
Val Ser Pro Thr Phe Gln Val Val Asn Ser Ile Ala Pro Val Gln Glu
1 5 10 15
Cys Ser Thr Gln Leu Asp Ile Val Ile Val Leu Asp Gly Ser Asn Ser
20 25 30
Ile Tyr Pro Trp Asp Ser Val Thr Ala Phe Leu Asn Asp Leu Leu Lys
35 40 45
Arg Met Asp Ile Gly Pro Lys Gln Thr Gln Val Gly Ile Val Gln Tyr
50 55 60
Gly Glu Asn Val Thr His Glu Phe Asn Leu Asn Lys Tyr Ser Ser Thr
65 70 75 80
Glu Glu Val Leu Val Ala Ala Lys Lys Ile Val Gln Arg Gly Gly Arg
85 90 95
Gln Thr Met Thr Ala Leu Gly Thr Asp Thr Ala Arg Lys Glu Ala Phe
100 105 110
Thr Glu Arg Ala Arg Arg Gly Val Lys Lys Val Met Val Ile Val Thr
115 120 125
Asp Gly Glu Ser His Asp Asn His Arg Leu Lys Lys Val Ile Gln Asp
130 135 140
Cys Glu Asp Glu Asn Ile Gln Arg Phe Ser Ile Ala Ile Leu Gly Ser
145 150 155 160
Tyr Asn Arg Gly Asn Leu Ser Thr Glu Lys Phe Val Glu Glu Ile Lys
165 170 175
Ser Ile Ala Ser Glu Pro Thr Glu Lys His Phe Phe Asn Val Ser Asp
180 185 190
Glu Leu Ala Leu Val Thr Ile Val Lys Thr Leu Gly Glu Arg Ile Phe
195 200 205
Ala Leu Glu Ala
210

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 7
Gly Arg Gln Gly Gly Leu
1 5

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> 人(Homo Sapiens)

<400> 8
Val Gln Arg Gly Gly Arg
1 5

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> 人(Homo Sapiens)

<400> 9
Val Gln Arg Gly Gly Arg
1 5

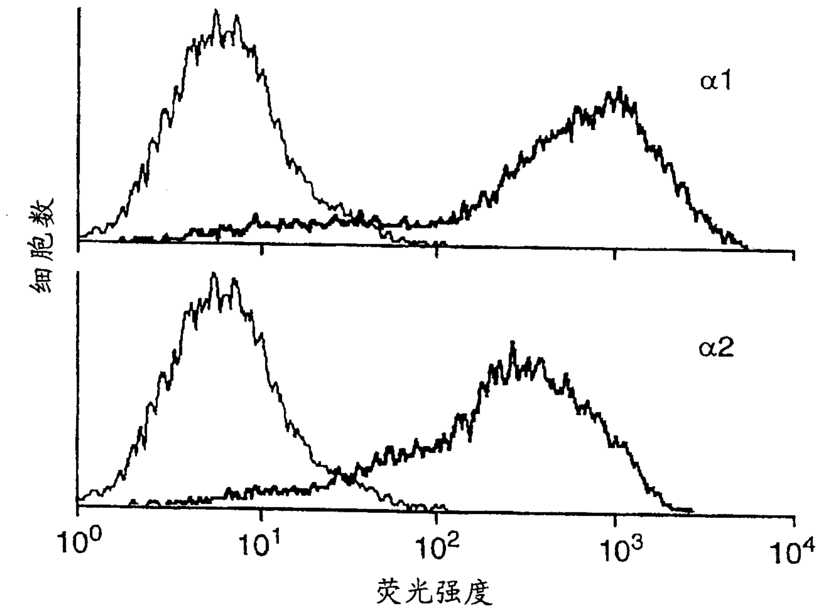


图 1A

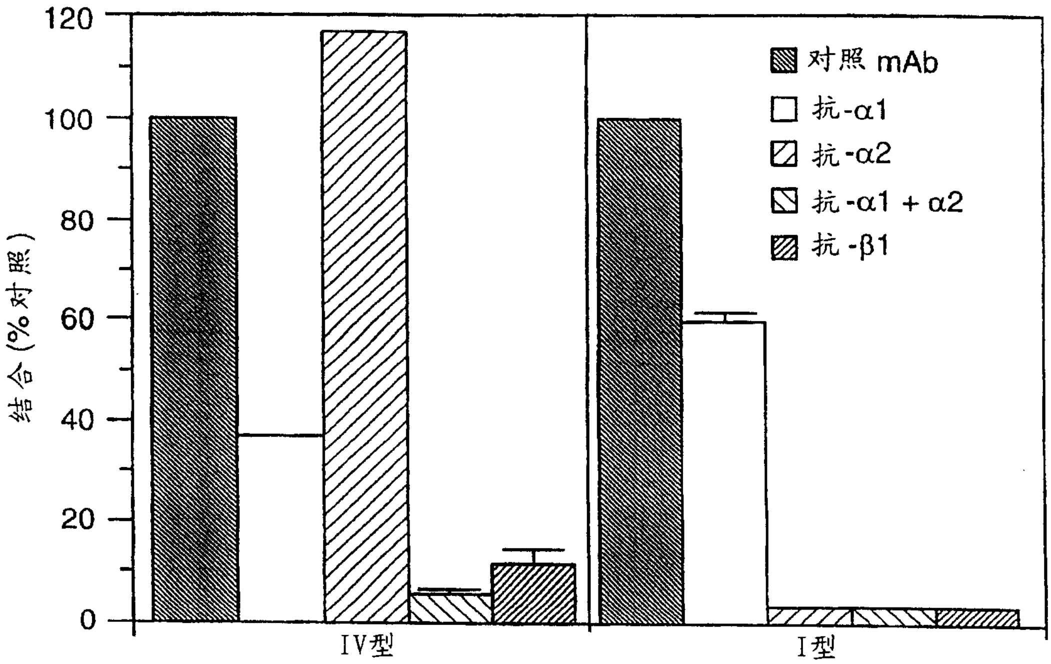


图 1B

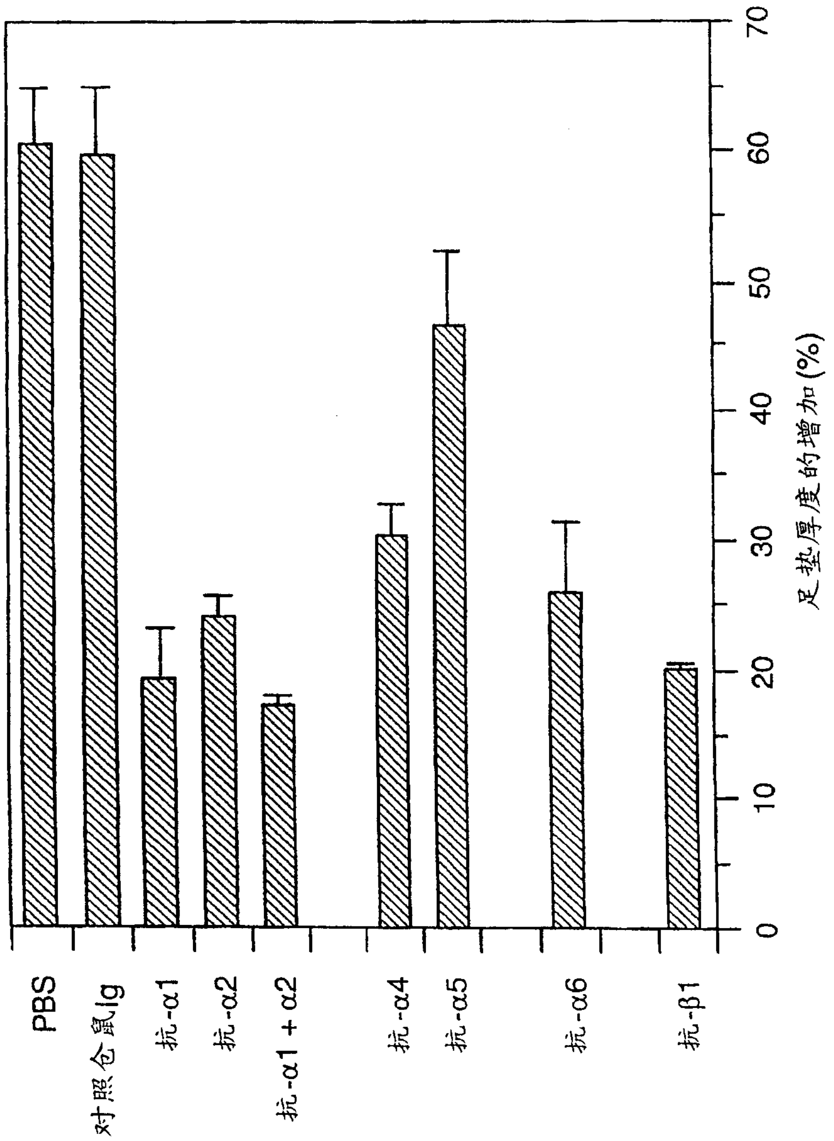

PBS
对照仓鼠Ig
抗-α1
抗-α2
抗-α1 + α2
抗-α4
抗-α5
抗-α6
抗-β1
0
10
20
30
40
50
60
70
足垫厚度的增加(%)

图 2

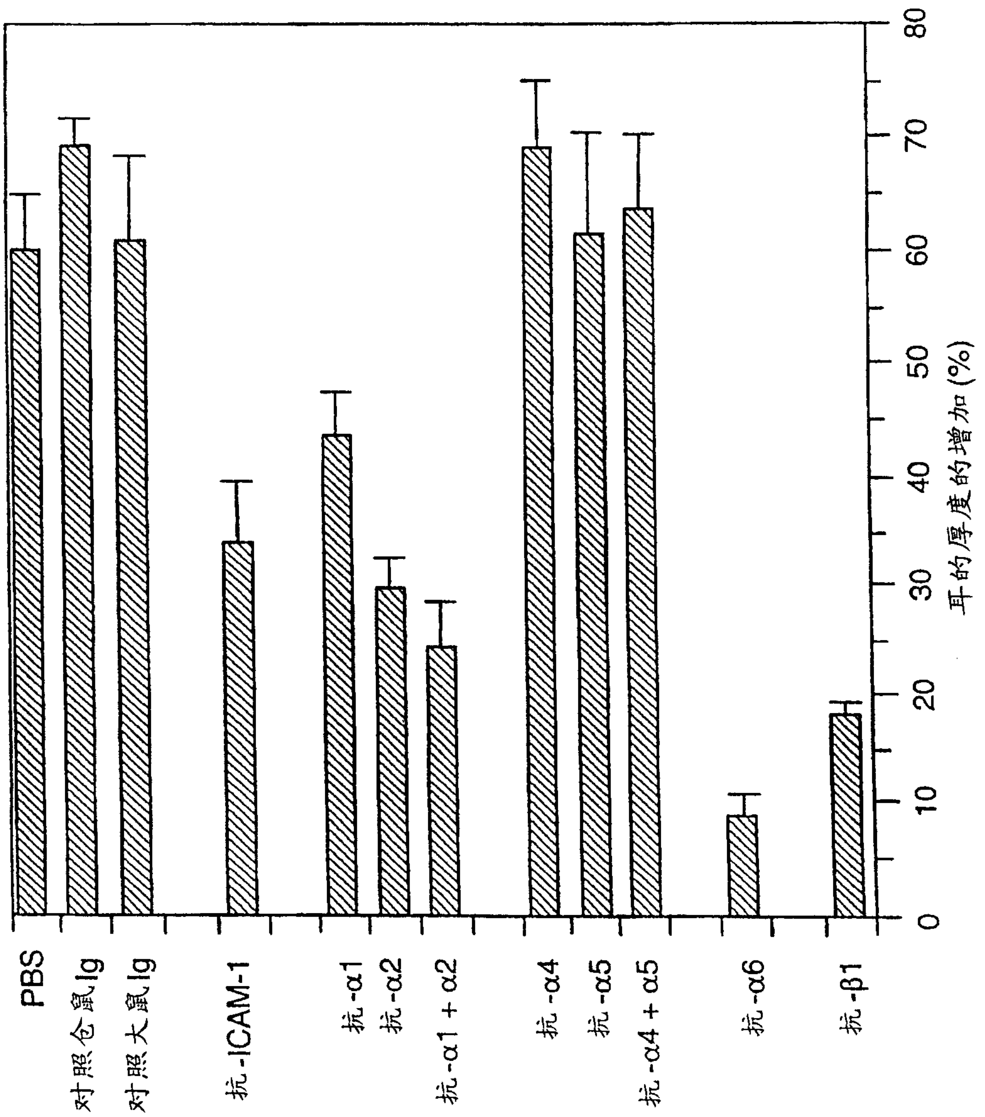

PBS
对照仓鼠Ig
对照大鼠Ig
抗-ICAM-1
抗-α1
抗-α2
抗-α1 + α2
抗-α4
抗-α5
抗-α4 + α5
抗-α6
抗-β1
0
10
20
30
40
50
60
70
80
耳的厚度的增加 (%)

图 3

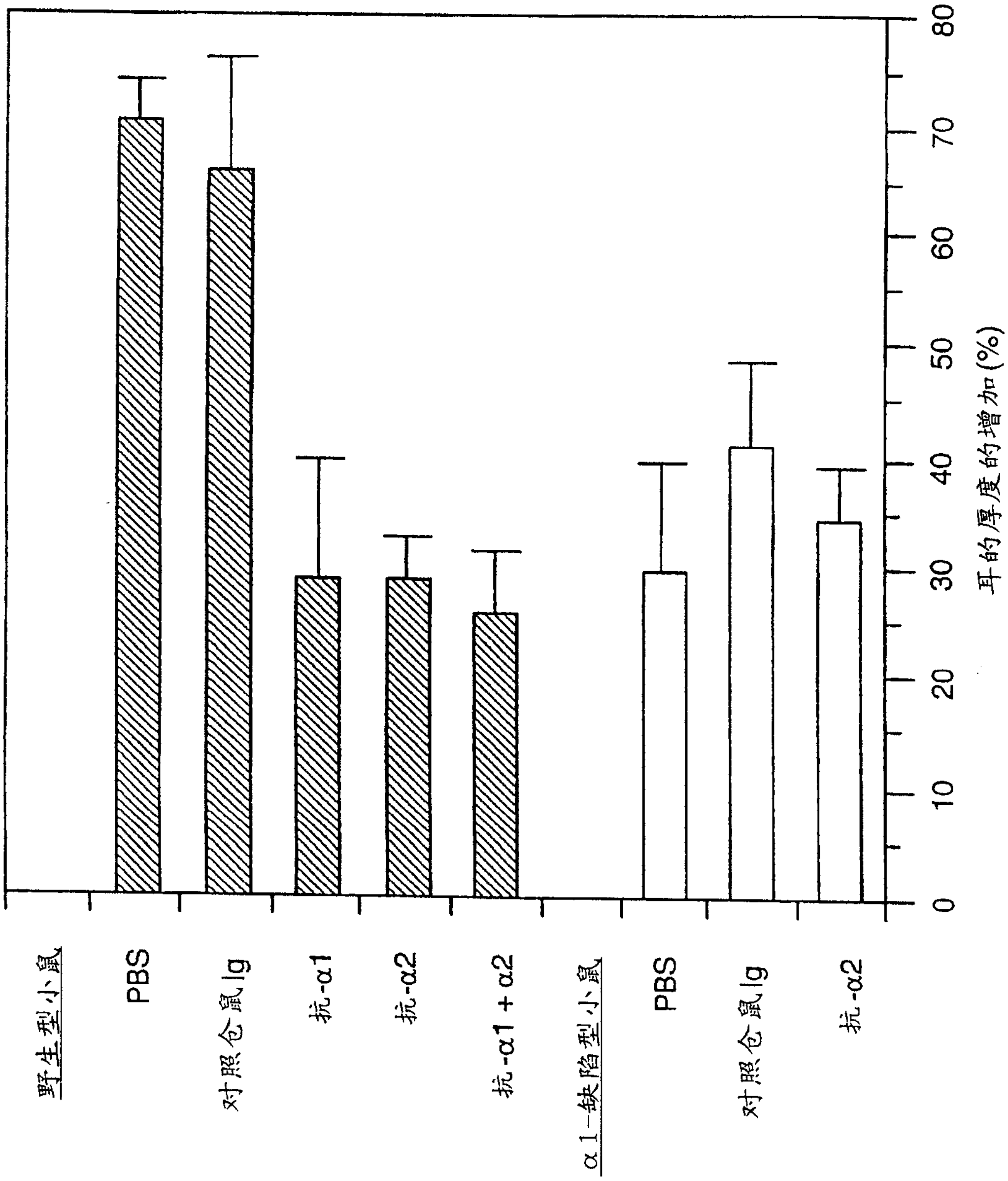

野生型小鼠
PBS
对照仓鼠Ig
抗-α1
抗-α2
抗-α1 + α2
α1-缺陷型小鼠
PBS
对照仓鼠Ig
抗-α2
0
10
20
30
40
50
60
70
80
耳的厚度的增加(%)

图 4

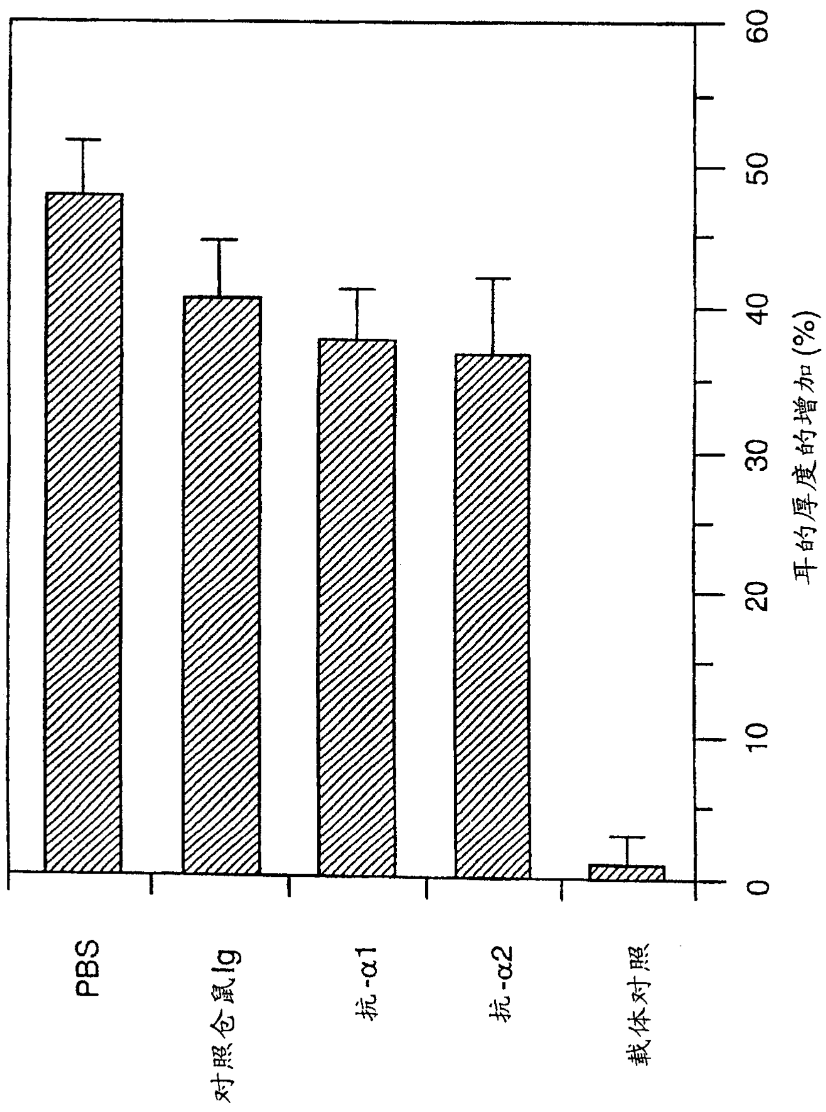


图 5

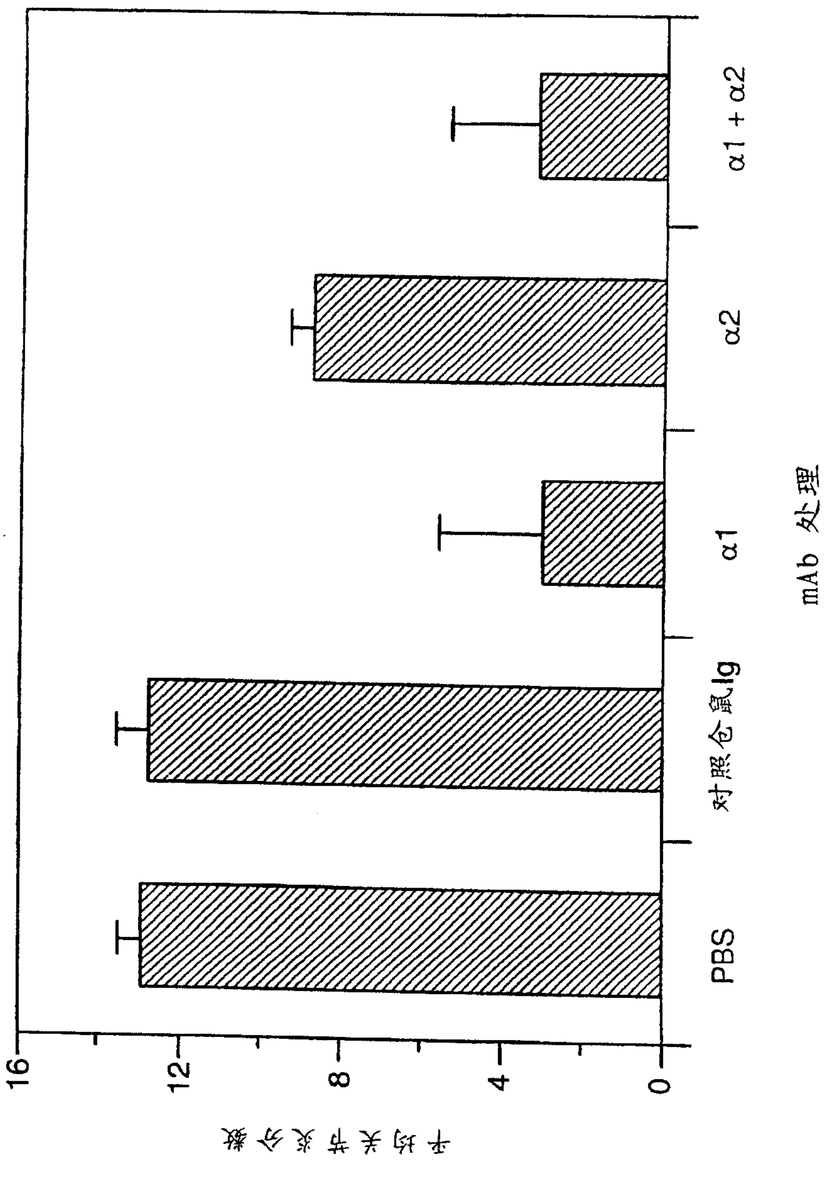


图 6

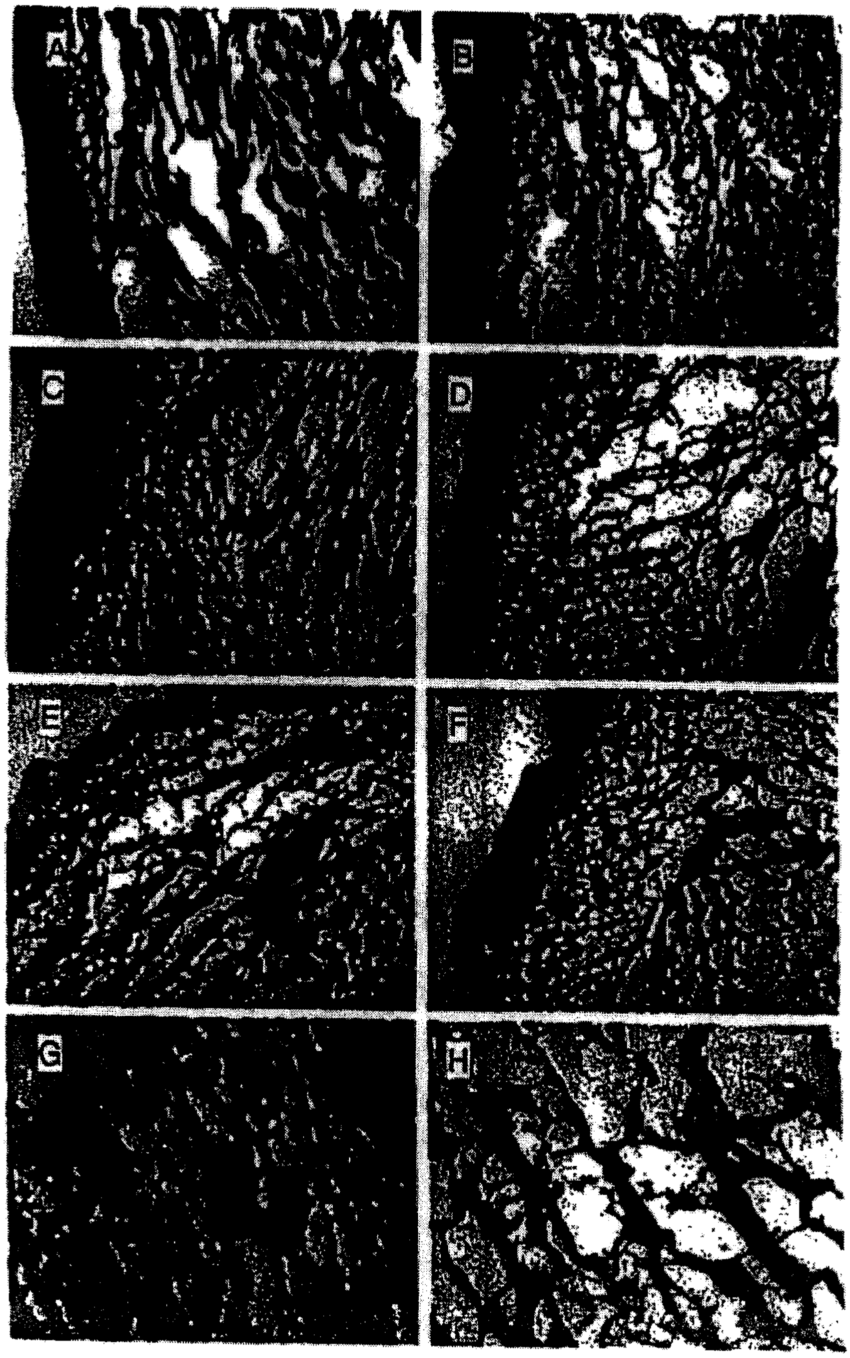


图 7

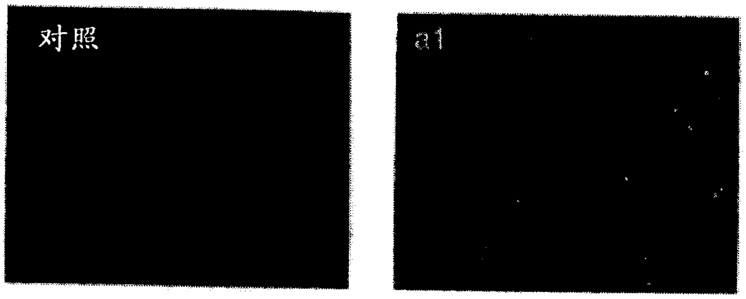


图 8A

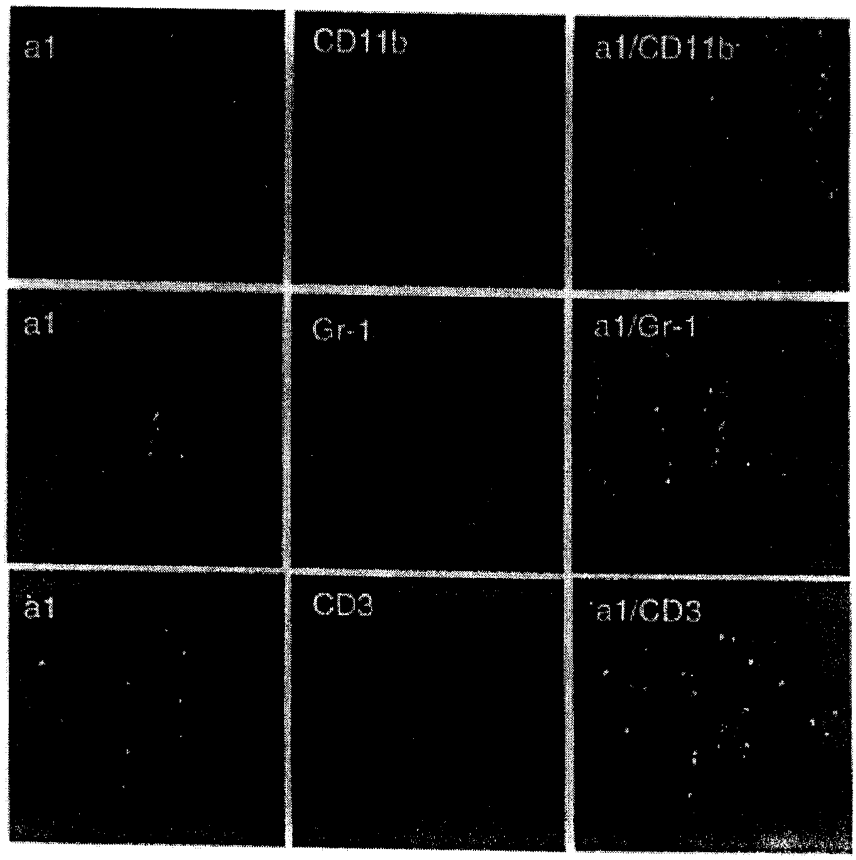


图 8B

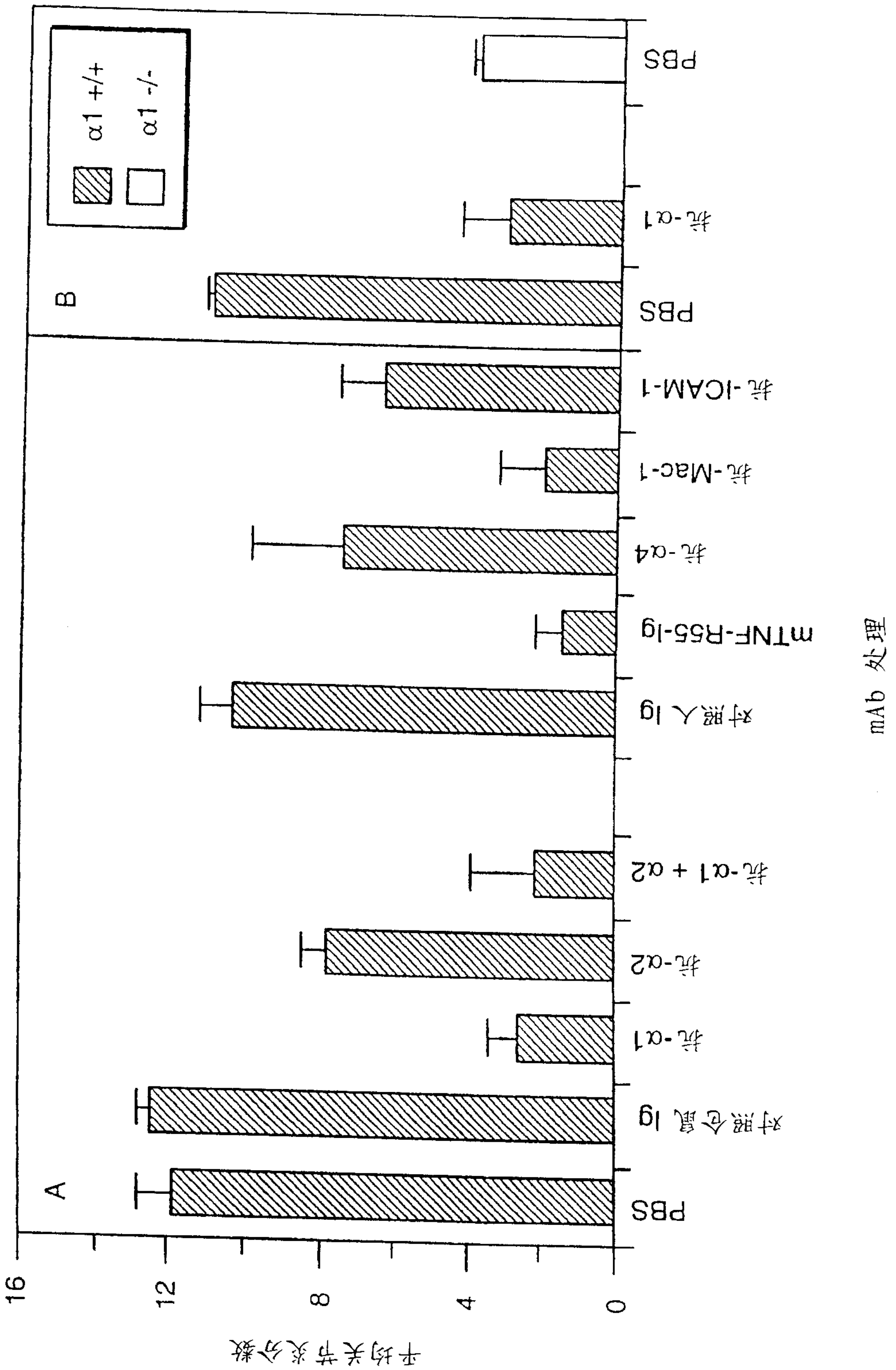
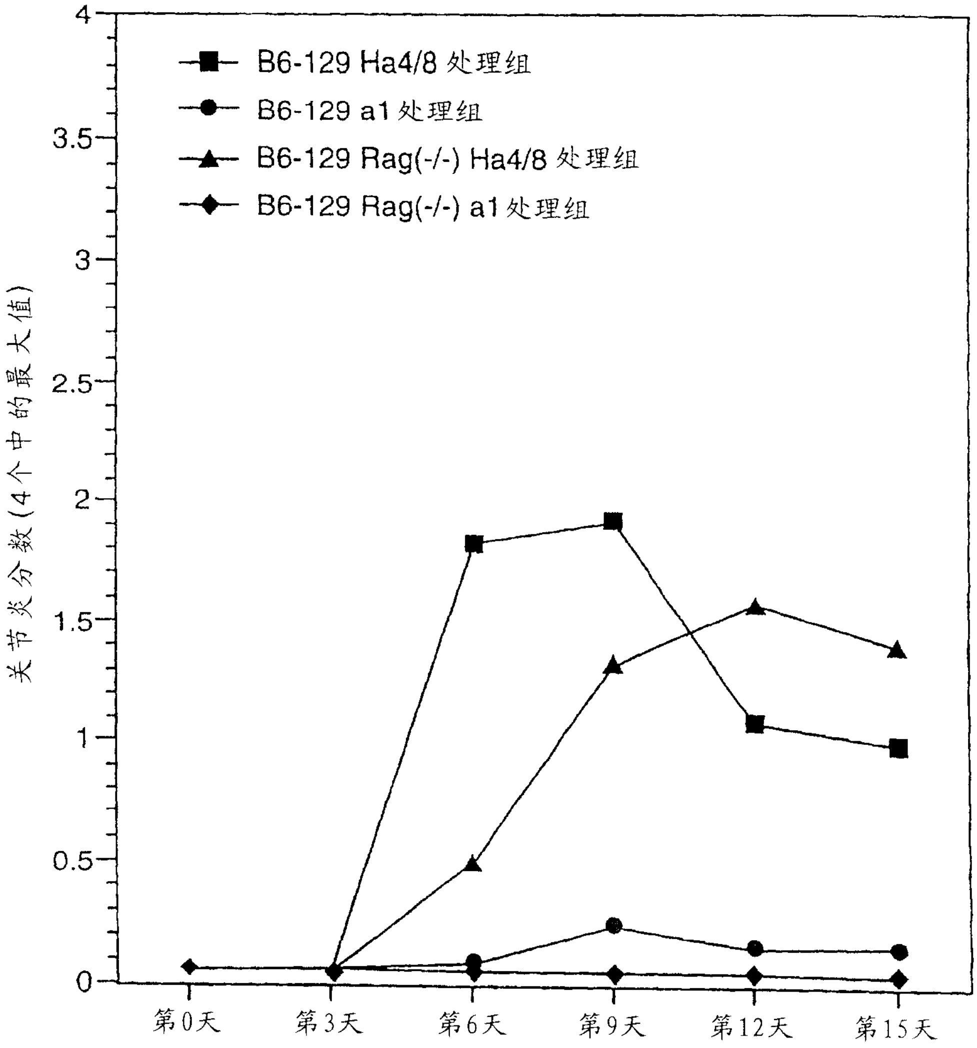

A
B
α1 +/+
α1 -/-
PBS
对照仓鼠 Ig
抗-α1
抗-α2
抗-α1 + α2
对照人 Ig
mTNF-R55-Ig
抗-α4
抗-Mac-1
抗-ICAM-1
PBS
抗-α1
PBS
0
4
8
12
16
平均关节炎分数
mAb 处理

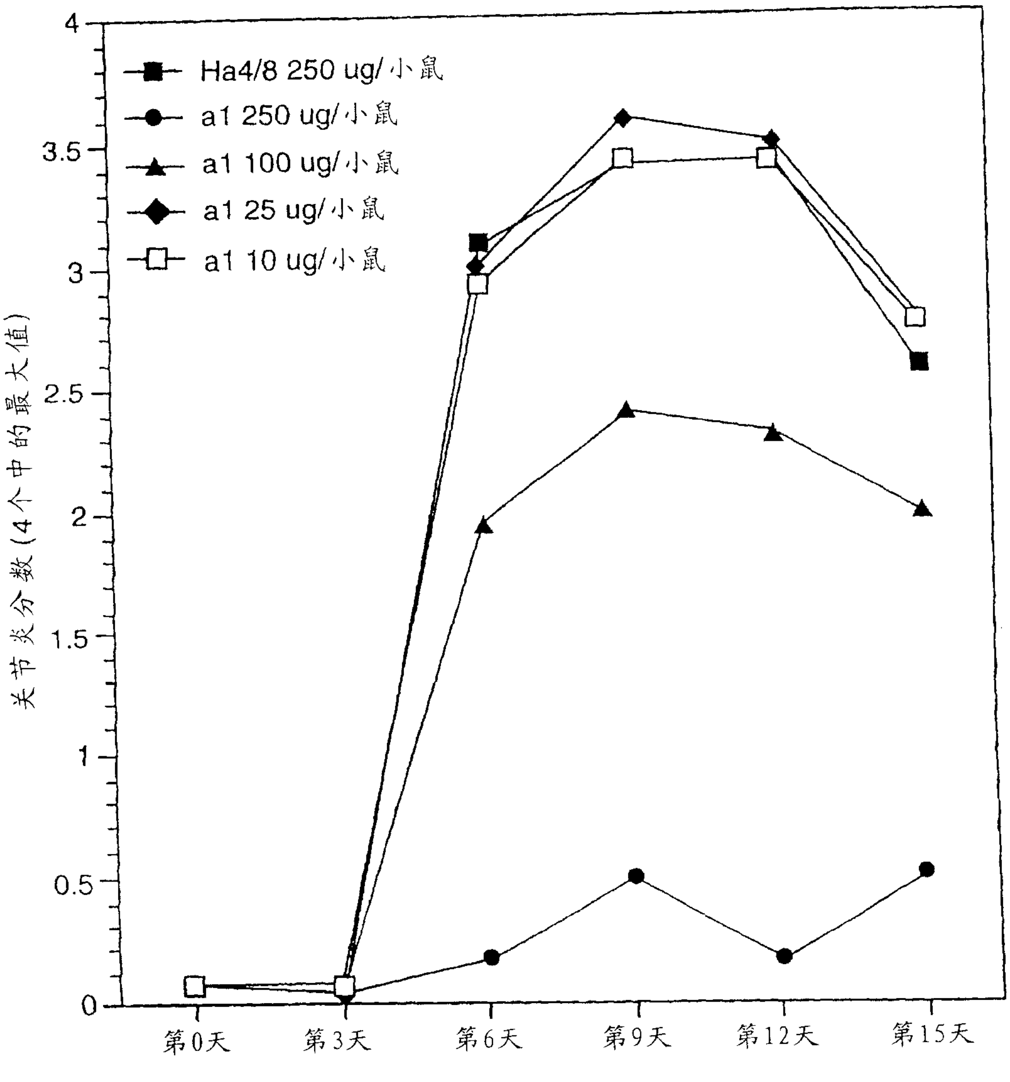
图 9

图 10



B6-129 Ha4/8 处理组
B6-129 a1 处理组
B6-129 Rag(-/-) Ha4/8 处理组
B6-129 Rag(-/-) a1 处理组
关节炎分数(4个中的最大值)
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
第0天
第3天
第6天
第9天
第12天
第15天

图 11



4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
关节炎分数(4个中的最大值)
Ha4/8 250 ug/小鼠
a1 250 ug/小鼠
a1 100 ug/小鼠
a1 25 ug/小鼠
a1 10 ug/小鼠
第0天
第3天
第6天
第9天
第12天
第15天

图 12

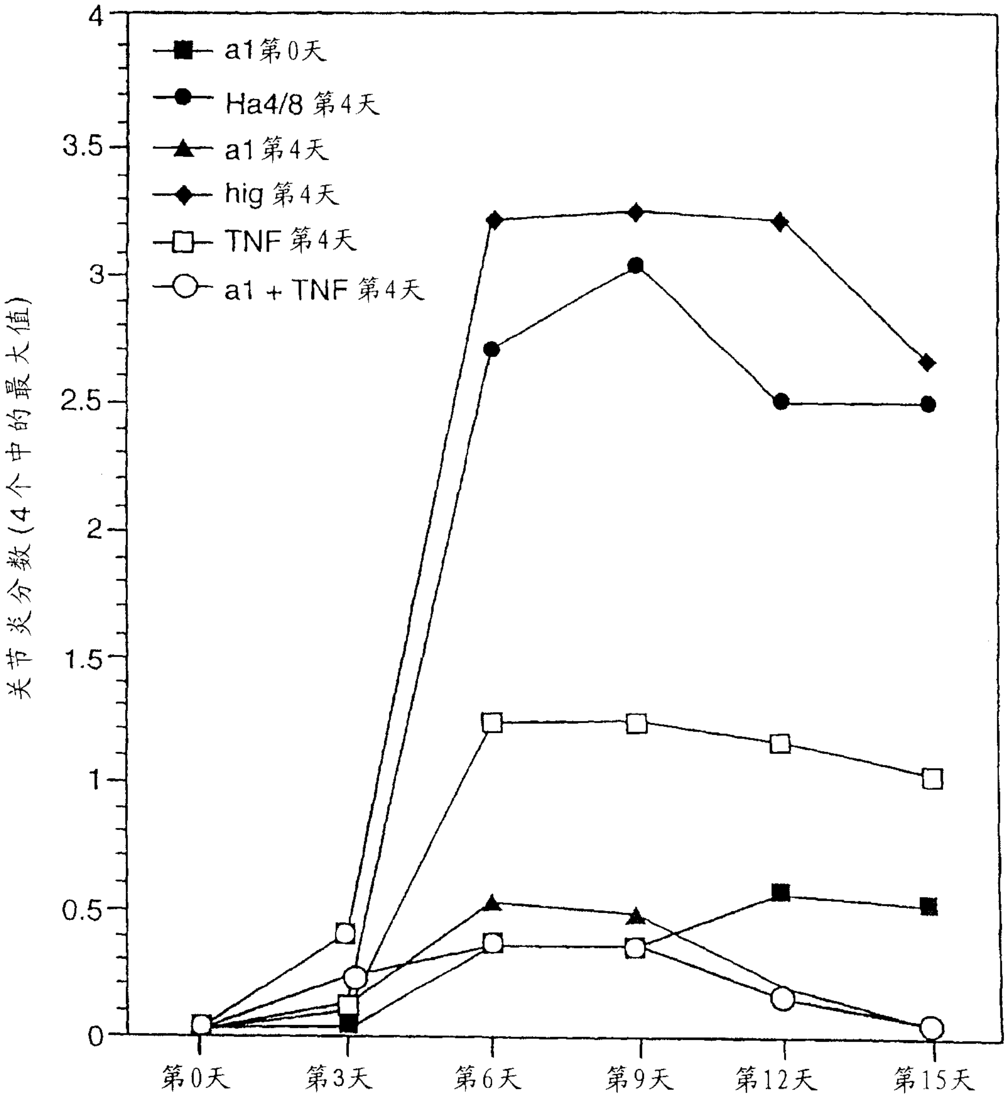

a1第0天
Ha4/8 第4天
a1 第4天
hig 第4天
TNF 第4天
a1 + TNF 第4天
关节炎分数(4个中的最大值)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
第0天
第3天
第6天
第9天
第12天
第15天

图 13

1	V	S	P	T	F	Q	V	V	N	S	F	A	P	V	Q	E	C	S	T	Q
											I									
21	L	D	I	V	I	V	L	D	G	S	N	S	I	Y	P	W	E	S	V	I
																	D			T
41	A	F	L	N	D	L	L	K	R	M	D	I	G	P	K	Q	T	Q	V	G
61	I	V	Q	Y	G	E	N	V	T	H	E	F	N	L	N	K	Y	S	S	T
81	E	E	V	L	V	A	A	K	K	I	G	R	Q	G	G	L	Q	T	M	T
											V	Q	R	G	G	R				
101	A	L	G	I	D	T	A	R	K	E	A	F	T	E	A	R	G	A	R	R
				T																
121	G	V	K	K	V	M	V	I	V	T	D	G	E	S	H	D	N	Y	R	L
																		H		
141	K	Q	V	I	Q	D	C	E	D	E	N	I	Q	R	F	S	I	A	I	L
		K																		
161	G	H	Y	N	R	G	N	L	S	T	E	K	F	V	E	E	I	K	S	I
		S																		
181	A	S	E	P	T	E	K	H	F	F	N	V	S	D	E	L	A	L	V	T
201	I	V	K	A	L	G	E	R	I	F	A	L	E	A						
				T																

图 14A

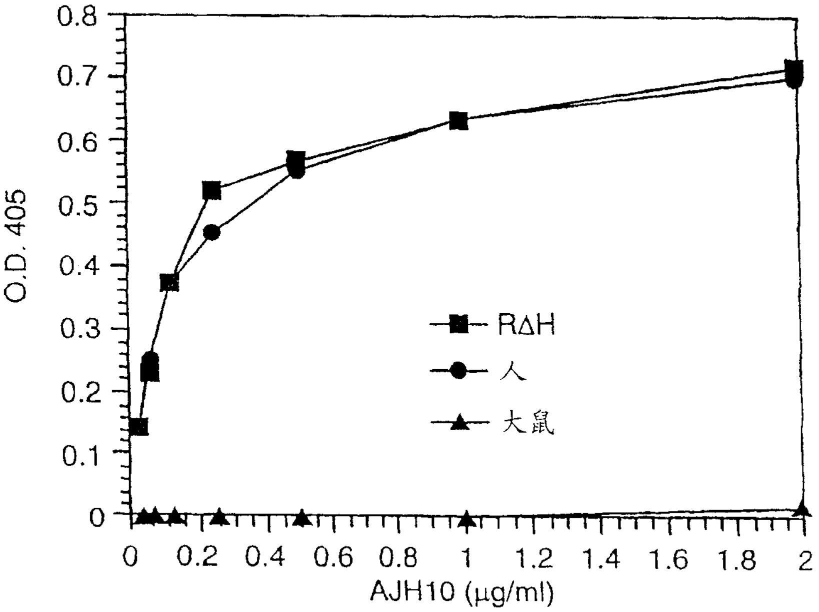


图 14B

1 V S P T F Q V V N S I A P V Q E C S T Q

21 L D I V I V L D G S N S I Y P W D S V T

41 A F L N D L L K R M D I G P K Q T Q V G

61 I V Q Y G E N V T H E F N L N K Y S S T

81 E E V L V A A K K I $\boxed{\text{V Q R G G R}}$ Q T M T

101 A L G T D T A R K E A F T E A R G A R R

121 G V K K V M V I V T D G E S H D N H R L

141 K K V I Q D C E D E N I Q R F S I A I L

161 G S Y N R G N L S T E K F V E E I K S I

181 A S E P T E K H F F N V S D E L A L V T

201 I V K T L G E R I F A L E A

图 15

图 16A

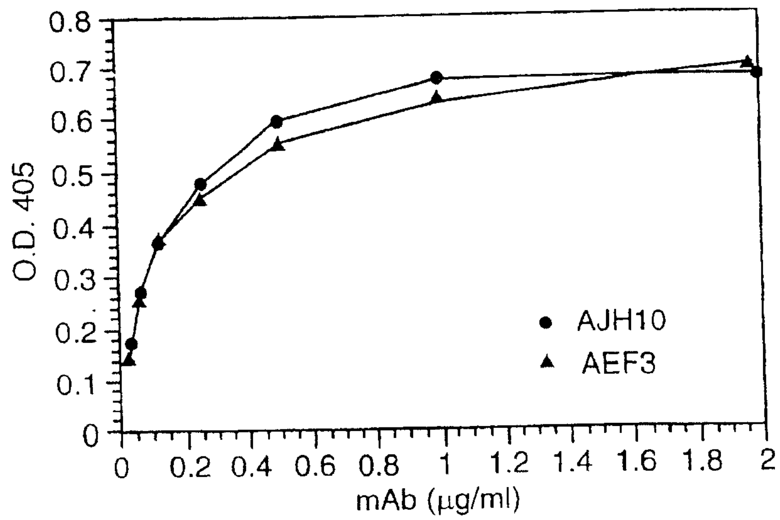


图 16B

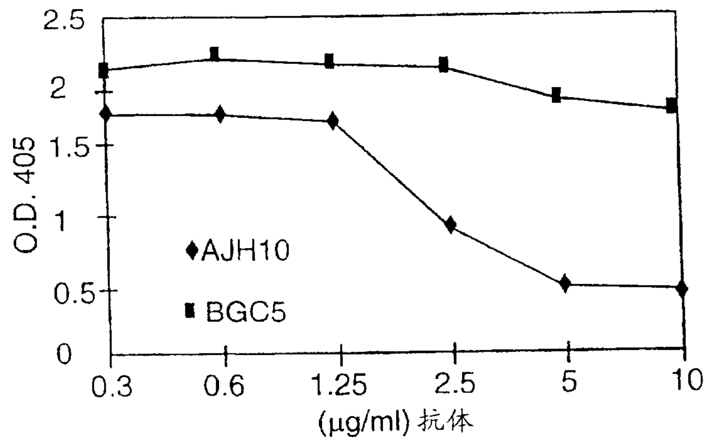
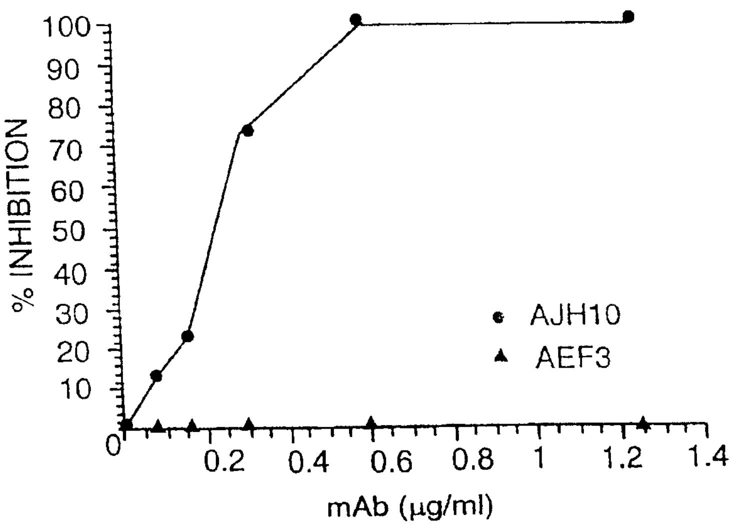


图 16C



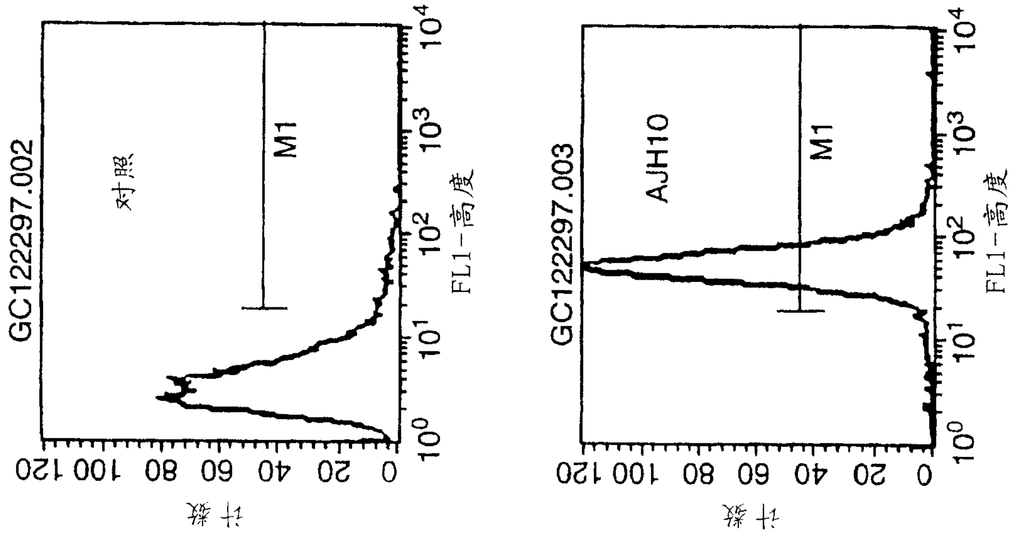

GC122297.002
对照
M1
计数
FL1-高度
GC122297.003
AJH10
M1
计数
FL1-高度

图 17B

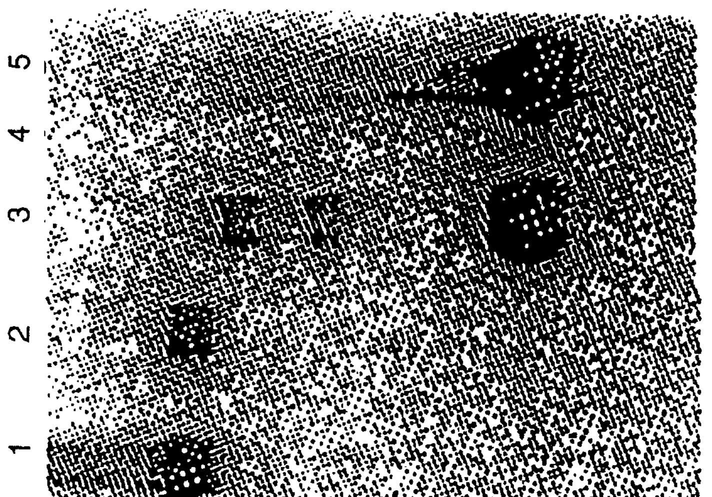

1
2
3
4
5
200
97
43

图 17A

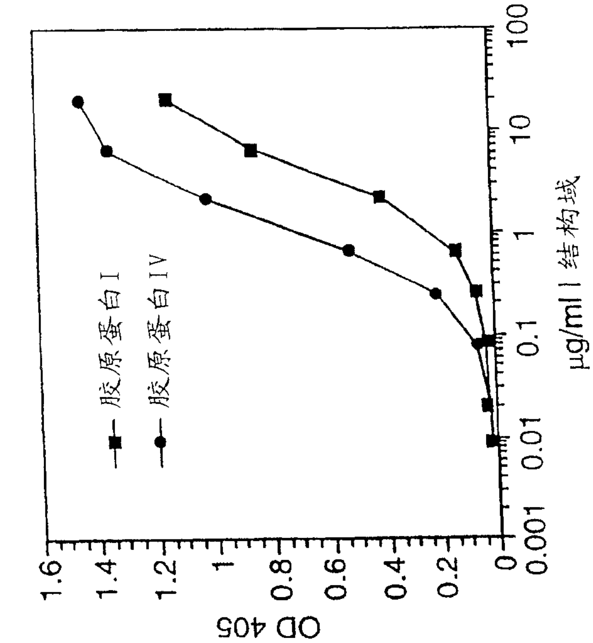


图 18A

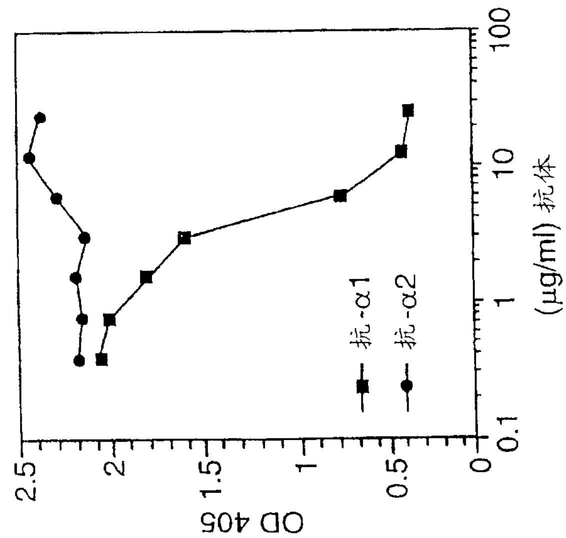


图 18B

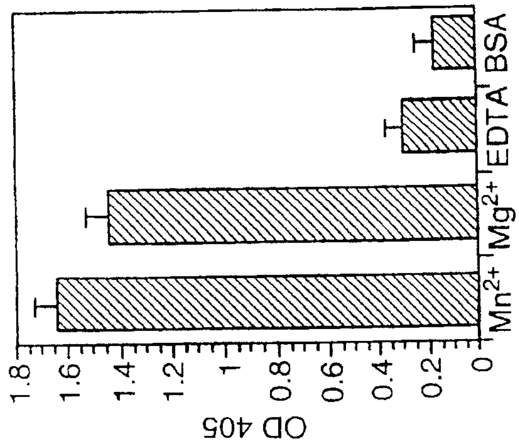


图 18C