

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 38/16



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00816148.8

A61K 38/17 A61K 39/395
C07K 14/00 C07K 14/435
C07K 16/00 C07K 16/28

[43] 公开日 2003 年 2 月 26 日

[11] 公开号 CN 1399554A

[22] 申请日 2000.9.22 [21] 申请号 00816148.8
[30] 优先权
[32] 1999. 9.23 [33] US [31] 09/405522
[86] 国际申请 PCT/US00/26095 2000.9.22
[87] 国际公布 WO01/21196 英 2001.3.29
[85] 进入国家阶段日期 2002.5.23
[71] 申请人 斯克里普斯研究学院
地址 美国加利福尼亚州
共同申请人 北卡罗来纳 - 查佩尔山大学
[72] 发明人 D·A·克雷斯 B·莱西

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 张广育 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 10 页

[54] 发明名称 抑制粘连形成的方法和组合物
[57] 摘要

本发明公开了抑制或改善手术后/创伤后患者粘连形成的组合物和方法。 这些组合物和方法应用能够阻断或抑制 $\alpha V\beta 3$ 整联蛋白与细胞外基质蛋白结合的拮抗剂分子, 所述细胞基质外蛋白如纤连蛋白。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 抑制粘连形成的方法, 包括阻断 $\alpha V \beta 3$ 整联蛋白与哺乳动物机体内细胞外基质蛋白结合的步骤。

2. 抑制手术后粘连形成的方法, 包括给手术患者应用粘连抑制剂量的拮抗剂分子, 所述拮抗剂分子能够阻断 $\alpha V \beta 3$ 整联蛋白的结合部位与细胞外基质蛋白的结合。

3. 权利要求 2 的方法, 其中所述细胞外基质蛋白是纤连蛋白。

4. 权利要求 3 的方法, 其中所述拮抗剂分子具有单克隆抗体 LM 609 的抗原结合位点。

5. 权利要求 3 的方法, 其中所述拮抗剂分子是单克隆抗体 LM 609。

6. 权利要求 3 的方法, 其中所述拮抗剂分子是单克隆抗体 LM 609 的抗原结合部分, 选自 Fab, Fab2, Fv 及其混合物。

7. 权利要求 2 的方法, 其中拮抗剂分子在生理兼容的溶液中给予, 并且浓度至少大约为 50 毫克/毫升。

8. 权利要求 2 的方法, 其中所述拮抗剂分子是单克隆抗体。

9. 权利要求 2 的方法, 其中所述拮抗剂分子是肽。

10. 权利要求 2 的方法, 其中所述拮抗剂分子是拟肽。

11. 权利要求 2 的方法, 其中所述拮抗剂分子是蛋白质。

12. 权利要求 2 的方法, 其中所述拮抗剂分子与可吸收固体载体共同给予。

13. 权利要求 2 的方法, 其中所述拮抗剂分子与可吸收明胶载体共同给予。

14. 权利要求 2 的方法, 其中所述拮抗剂分子与作为载体的膏药共同给予。

15. 权利要求 2 的方法, 其中所述拮抗剂分子腹膜内给药。

16. 权利要求 2 的方法, 其中所述拮抗剂分子皮下给药。

17. 权利要求 2 的方法, 其中所述拮抗剂分子静脉内给药。

18. 适用于减轻粘连形成的组合物, 包括拮抗剂分子和生理可接受、可吸收的固体载体, 所述拮抗剂分子可以阻断 $\alpha V \beta 3$ 整联蛋白上的结合位点与细胞外基质蛋白的结合。

19. 权利要求 18 的组合物, 其中所述细胞外基质蛋白是纤连蛋白。

20. 权利要求 19 的组合物, 其中拮抗剂分子具有单克隆抗体 LM 609

说明书

抑制粘连形成的方法和组合物

政府权利陈述

- 5 本文描述的工作部分由 NIH 基金 HD34824 支持。美国政府在本发明中享有一定权利。

发明领域

本发明涉及医药和抑制手术后/创伤后粘连形成领域。

方面背景

- 10 手术干预为了达到治愈的目的，涉及对患者的损伤。手术的一个不欲结果是手术后粘连形成。在医学领域，术语“粘连”是指粘附，即两个表面或部分的粘连或结合过程。例如，相对创面，或相对腹膜的结合。复数形式的“粘连”还指炎症结合，这种结合将含浆液的相对表面连接。本文应用的术语“粘连”还包括纤维蛋白的粘连，这种粘连包括血浆或
15 淋巴液渗出或血液渗出导致的纤维蛋白细丝的粘连。在损伤部位由于成纤维组织平缓过量生长导致的瘢痕，偶尔自发形成，也是粘连的一种形式。

- 业已报导，粘连发生是手术后病废和死亡的主要原因。包括显著粘连形成的最常见的手术过程是妇科手术，心血管手术和腹部大手术。无论传统手术还是腹腔镜手术，都涉及显著粘连。
20 腹腔内粘连并发症包括肠梗阻，慢性或复发性盆腔疼痛，女性不孕，以及手术时间延长，手术后并发症（当需要进行其他手术时）。在个别病例中，轻微的粘附可以通过粘连切离术、手术切除或粘连溶解（粘连溶解）来治疗。因此，在患者中抑制粘连形成的方法和组合物是最有用途的。
25 随着兽医手术技巧和技能的增长，动物的价值，无论情感的还是经济的，也随之增加，因此动物手术变得越来越常见。动物也面临同样的问题，即手术后粘连形成和粘连带来的负性影响。对动物手术过程的人性化关爱，使很多源于人类的诊断和手术技术用于动物。因此，抑制动物粘连形成的方法和组合物也是非常有用的。
30 绝大多数粘连始于组织表面间纤维蛋白基质的形成，因此测试了物理屏障，通过在腹膜愈合过程中限制组织并置来预防粘连形成。通常的

的抗原结合位点。

21. 权利要求 19 的组合物，其中拮抗剂分子是鼠单克隆抗体 LM 609。

22. 权利要求 19 的组合物，其中拮抗剂分子是人源化单克隆抗体 LM 609。

23. 权利要求 19 的组合物，其中所述分子是单克隆抗体 LM 609 的抗原结合部分，选自 Fab, Fab2, Fv 及其混合物。

24. 权利要求 18 的组合物，其中拮抗剂分子是单克隆抗体。

25. 权利要求 24 的组合物，其中拮抗剂分子是单克隆抗体的抗原结合片段。

26. 权利要求 18 的组合物，其中所述可吸收固体载体是明胶。

27. 权利要求 18 的组合物，其中拮抗剂分子是蛋白质。

28. 权利要求 18 的组合物，其中拮抗剂分子是肽。

29. 权利要求 18 的组合物，其中拮抗剂分子是拟肽。

30. 适用于减轻手术后粘连的组合物剂的包装剂型，包括拮抗剂分子和生理可接受载体，所述拮抗剂分子可以阻断 $\alpha V \beta 3$ 整联蛋白的结合位点与细胞外基质蛋白的结合；所述剂型还包括标签，提示包装的抑制剂组合物可用于抑制粘连形成。

31. 权利要求 30 的包装剂型，其中所述细胞外基质蛋白是纤连蛋白。

32. 权利要求 31 的包装剂型，其中所述拮抗剂分子具有单克隆抗体 LM 609 的抗原结合位点。

33. 权利要求 31 的包装剂型，其中所述拮抗剂分子是鼠单克隆抗体 LM 609。

34. 权利要求 31 的包装剂型，其中所述拮抗剂分子是人源化单克隆抗体 LM 609。

35. 权利要求 31 的包装剂型，其中所述拮抗剂分子是单克隆抗体 LM 609 的抗原结合部分，选自 Fab, Fab2, Fv 及其混合物。

物理屏障是膜或凝胶，用于减少损伤腹膜的并置，直至再次腹膜化发生，因此抑制或预防粘连形成。在鼠模型系统中，再次腹膜化大约需要七（7）天。业已发现，在鼠模型系统中，屏障需要放置至少 36 天，来预防粘连形成（Harris et al., 1995, Surgery, 117: 663-9）。

- 5 尽管已经测试了多种辅助制剂在动物模型中预防粘连的效果，目前只有三种屏障获准用于人类，降低手术后粘连形成。Interceed™（Johnson & Johnson Medical）是氧化的再生纤维素；Seprafilm™（Genzyme Corp.）是修饰的透明质酸和修饰的羧甲基纤维素复合物；Preclude™（W. L. Gore）是延长的聚四氟乙烯。Interceed™适用于没有血的情况。Preclude™
10 已获准用作心包替代物，但不能生物再吸收。Seprafilm™已获准用于腹壁和子宫切口。

- 在鼠系统中测试的潜在抗粘连剂包括乳酸林格氏液，32%右旋葡萄糖苷 70 溶液，以及 1% 和 2% 的修饰羧甲基纤维素溶液。一半的溶液用于切口，剩余的液体在腹腔内聚集。乳酸林格氏液无效，因为在腹腔内
15 很快吸收，因此在非常重要的整个 36 小时内不存在。而其他稍微粘稠的溶液则更加有效。

- 透明质酸（HA）业已在腹盆腔和整形外科手术中用作屏障。修饰的 HA 作为能够再吸收的凝胶，以及基于透明质酸凝胶的自发交联多糖（ACP），也在测试。透明质酸衍生物 ACP 业已显示，在兔模型系统中，
20 可以预防腹腔镜的粘连形成，见于 Delaco et al., 1998, Fertility and Surgery, 69(2): 318-323 的报导。

Leach et al., 1998, Fertility and Surgery, 69(3): 415-418 将化学修饰的透明质酸和羧甲基纤维素（HA/CMC）凝胶制剂用于兔模型系统。

- Rodgers et al., Fertility and Surgery, 69(3): 403-408 进行了在兔模型系
25 统中评价聚乙烯二醇/聚乳酸（EG/LA）膜预防粘附形成的工作。

因此，在医学领域始终存在这样一种需求，即在动物以及人类中抑制或预防粘连形成的材料和方法。

发明简述

- 30 本发明提供了在哺乳动物中抑制或改善粘连形成的所需组合物和方法，所述哺乳动物包括人类。

通过应用与 $\alpha V \beta 3$ ($\alpha v \beta 3$) 整联蛋白相互作用的拮抗剂分子、或应用与细胞外基质蛋白整联蛋白结合位点相互作用的拮抗剂分子治疗创伤

或手术部位，阻断 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白与哺乳动物体内细胞外基质蛋白的结合，可以抑制或至少改善由于创伤或外科手术导致的粘连。用于此目的的适宜拮抗剂分子是蛋白质、肽（线形以及环状）和拟肽

(peptidomimetic)，所述分子能够模拟细胞外基质蛋白如纤连蛋白的 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白结合位点，或者能够与 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白结合，干扰其与细胞外基质蛋白的结合。这些 $\alpha v \beta 3$ 拮抗剂分子的示例是单克隆抗体及其生物活性部分或片段，包括模拟或阻断细胞外基质蛋白的 $\alpha v \beta 3$ 结合位点，或者与 $\alpha v \beta 3$ 分子的抗原决定簇特异性结合，这样，可以达到抑制 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白与细胞外基质蛋白结合的作用。一种这样的单克隆抗体是完整的

10 LM609，及其生物活性抗原结合部分或片段，如 Fab, Fab2, Fv 及其混合物。无论鼠单克隆抗体 LM609，还是人源化单克隆抗体 LM609，均适用于本目的。

此外，还可应用纤连蛋白片段作为 $\alpha v \beta 3$ 拮抗剂分子，用于本发明目的，干扰 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白与纤连蛋白或其他任何细胞外基质蛋白的结合，15 所述纤连蛋白片段包括与纤连蛋白上 $\alpha v \beta 3$ $\alpha V \beta 3$ 结合位点相对应的氨基酸残基序列，并可包括例如 Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) 的氨基酸残基序列或其生物等价片段，所述细胞外基质蛋白具有由 RGDS 氨基酸残基序列或其生物等价片段定义的结合位点。

还适用的是所谓的拟肽，即非肽有机化合物，模拟上述肽与 $\alpha v \beta 3$ 整20 联蛋白相互作用，干扰 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白与细胞外基质蛋白的结合，所述细胞外基质蛋白如纤连蛋白等。

通过在手术部位直接应用或在生理兼容载体中应用粘连抑制剂量的至少一种上述 $\alpha v \beta 3$ 拮抗剂分子，可以抑制或至少使粘连形成最小化。这些拮抗剂的应用可以通过腹腔内给药 (i.p.)、皮下注射 (s.c.)、静脉内25 给药 (i.v.) 或其他适宜给药途径容易地进行。

适宜的载体可以是液体的，也可以是生理可接受可吸收的膏药和固体。拮抗剂分子可以拮抗剂组合物的形式应用，所述组合物是将拮抗剂分子溶于水性载体或以悬液形式出现，通常浓度至少大约为 50 微克每毫升 (ug/ml)。同样，拮抗剂组合物还可以是由溶液或悬液中的抑制剂组30 成的可吸收膏药或固体，可吸收明胶海绵或明胶粉、或可吸收的干的水凝胶、可吸收透明质酸衍生物等可以作为载体。 $\alpha v \beta 3$ 拮抗剂组合物可以适宜剂量形式包装，并提供标签，提示包装中包括的抑制剂组合物可用

于抑制粘连形成。

本发明预期的 $\alpha v\beta 3$ 拮抗剂能够与细胞外基质蛋白或 $\alpha v\beta 3$ 整联蛋白分子结合；但是，这种结合必须干扰 $\alpha v\beta 3$ 整联蛋白与细胞外基质蛋白上的结合位点的正常相互作用才有效。这些细胞外基质蛋白的示例如纤连蛋白，纤维蛋白原，副纤连蛋白，血管性血友病因子，层粘连蛋白，胶原，细胞粘素，骨桥素，血小板反应素等。

抑制手术后粘连形成的优选方法包括给手术患者（人或者兽医）应用粘连抑制剂量的 $\alpha v\beta 3$ 整联蛋白抑制剂分子。给药方式包括将一等分抑制剂组合物应用于希望不产生粘连的组织表面，可以直接应用，也可以气雾喷射，或者通过敷料、凝胶、溶液、悬液等作为适宜载体进行应用。

优选实施方案详述

粘连形成作为创伤愈合过程中的异常现象发生，涉及细胞粘附和成纤维细胞迁徙。粘连的发生通常是创伤或手术时出血的结果，所述手术破坏了腹膜表面的完整性，并导致间质层暴露。随后，这种暴露导致激肽和组胺的释放，反过来增加毛细血管的通透性，使含有炎症细胞的血清血液渗出物释放。该渗出物富含纤维蛋白，导致损伤表面血凝块的形成。血凝块不分解，炎症细胞和成纤维细胞对富含纤维蛋白的细胞外基质的浸润，导致粘连形成。

细胞外基质包括蛋白质的互动网络，细胞在形成的网格上粘附于器官组织。构成细胞外基质的大分子主要由局部基质中的细胞分泌。在绝大多数结缔组织中，这些大分子主要由成纤维细胞或成纤维家族细胞分泌，所述成纤维家族细胞如成软骨细胞或成骨细胞。构成基质的两类主要细胞外大分子是多糖粘多糖（GAGs），通常与蛋白质共价连接，以蛋白多糖和纤维蛋白的形式存在。纤维蛋白通常被认为以两种功能类型之一存在：主要是结构蛋白（例如胶原和弹性蛋白）和主要是粘附蛋白（例如纤连蛋白和层粘连蛋白）。见例如 *The Molecular Biology of the Cell*, 2nd ed. (Alberts et al., editors, Garland Publishing, Inc., New York, 1989) 802-824。

细胞粘附控制胚胎组织和细胞外基质中的细胞迁徙、生长和分化，并对恶性细胞的形成、炎症、免疫调控和止血有一定作用。细胞粘附的介质，跨膜细胞受体，包括整联蛋白，免疫球蛋白超基因家族，钙依赖粘附素，选择素，CD44 相关分子以及跨膜蛋白多糖（见 Chothia & Jones,

1997, *Ann. Rev. Biochem.*, 66: 823-62)。整联蛋白是一类重要的结合蛋白，可以与多种配体相互作用。 $\alpha v\beta 3$ 整联蛋白是一种膜结合糖蛋白，并经鉴定是细胞与细胞之间粘附、迁徙的重要物质。整联蛋白能够与多种配体结合，所述配体包括细胞外基质组分，细胞表面免疫球蛋白 (Ig)
5 超家族受体，微生物表面组分，以及某些胞浆蛋白。综述见 Loftus, J.C. et al., 1994, *J. Biol. Chem.*, 269 (4): 25235-25238。

杂交瘤细胞系 LM 609 产生的鼠单克隆 (mAb) IgG 抗体 LM609 特异性针对整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ (Cheresh et al., 1987, *J. Biol. Chem.*, 262: 17703-17711)。根据布达佩斯条例，鼠杂交瘤 LM609 业已于 1987 年 9
10 月 15 日作为国际储存权威储存于美国种类培养处 (ATCC, Rockville, MD, USA)，分配的 ATCC 命名为 HB 9537。

LM 609 的 cDNA 业已克隆，其可溶性 Fab 部分也已从转化组织细胞中制备。LM609 抗体也经人源化处理，以减轻其免疫原性 (WO 99/29888)。

15 适用于作为 $\alpha v\beta 3$ 拮抗剂分子的蛋白和肽包括纤连蛋白上 $\alpha v\beta 3$ 的互补结合位点，氨基酸残基序列 RGDS，或其生物等价物。肽可以是线形的，也可以是环状的。

还适用的是无毒的非肽有机化合物，该有机化合物定义了一个区域，与 $\alpha v\beta 3$ 整联蛋白结合位点基本互补，或者与细胞外基质蛋白上 $\alpha v\beta 3$
20 整联蛋白结合位点基本互补。

在应用中，为了抑制粘连形成， $\alpha v\beta 3$ 整联蛋白拮抗剂分子可以以气雾粉的形式、或者存在于生理兼容载体中，直接用于手术部位，所述生理兼容载体可以是液体如水，单独或与可吸收粉剂以膏药的形式应用。这些可吸收粉剂的示例如无菌明胶粉末，可以以 GELFOAM® 的名义购买
25 (Upjohn Co.)。此外， $\alpha v\beta 3$ 整联蛋白拮抗剂分子还可以通过无菌明胶泡沫或海绵、美国专利号 5,409,703 和 McAulley et al., 所述类型的可吸收的干的水凝胶、或透明质酸衍生物应用于手术部位。对于腹膜内 (i.p.)、皮下 (s.c.) 或静脉内 (i.v.) 给药，优选的载体是水溶性载体，如水或水溶性盐溶液。

30 以前业已描述了粘连形成的兔侧壁模型 (Rogers et al., 1996, *J. Invest. Surg.* 9: 388-91; Rodgers et al., 1998, *supra*)。应用每 kg 兔体重 55 mg 盐酸氯胺酮和每 kg 5 mg 甲苯噻嗪混合麻醉兔。无菌手术准备后，进行中线

腹腔镜手术。将盲肠和小肠从腹腔中取出，数字加压，在所有可能接触侧壁损伤区域的肠表面产生浆膜下出血。然后应用 4'' 4 × 4 层无菌纱布轻轻磨擦损伤的小肠，直至观察到点状出血。然后将盲肠和小肠推回到它们正常的解剖位置。

- 5 该兔模型与 Harris et al. (1995, supra) 等描述的标准大鼠粘连形成模型非常类似。在该大鼠模型中，创建腹壁缺损和盲肠磨损，空气中干燥 10 分钟，关腹前使两处损伤表面置于接触状态。腹腔内应用戊巴比妥钠 (43 mg/kg) 给大鼠麻醉。腹部备皮，涂抹碘，然后用 70% 酒精冲洗。在中线皮肤开 6cm 切口，然后将皮肤卷起。在腹壁中线开 4cm 切口，弃去右侧腹壁。在中线切口侧面 1cm，从腹壁整齐切除 1 × 2 cm 的壁腹膜，包括表浅的潜在肌肉层。然后将盲肠位置提高，这样关腹后，可以使盲肠接触腹壁缺损。此后，用解剖刀片，以标准方式刮磨盲肠，直至在 1 × 2 cm 的区域内出现斑点状表面出血。腹壁缺损也进行磨擦。腹壁和盲肠缺损在空气中暴露 10 分钟。然后使缺损接触，应用 4-0 聚丙烯缝合线缝合中线切口，并用 4-0 丝线缝合皮肤 (Harris et al., 1995, supra)。

- 15 另一个研究生殖器官粘连的兔系统为兔子宫角模型。在该模型中，开中线切口，将子宫角从切口中牵出。然后应用手术纱布磨擦子宫角整个边长大约 5 cm 长的区域，并用解剖刀片磨刮 12 次。这种损伤可以导致广泛的红斑形成，但没有活动性出血区域。然后将子宫角重置于腹腔，缝合伤口。

- 20 随着腹腔镜手术器械和技术的出现，这种损伤较小的手术变得有赖于常见。但是，粘连形成仍然是这种腹腔镜手术可能的并发症。业已应用兔动物模型来研究腹腔镜粘连预防 (Delaco, et al., 1998, supra)。简言之，将 Verres 针经中线进入腹壁，插入腹腔，然后应用自动腹腔注入器注入二氧化碳气体。然后在腹壁的相同位置插入套管针。通过套管针将关节镜插入腹腔，并应用 Xenon 300 W 作为光源。所有手术过程依靠内
- 25 镜的显微照相机进行。观察腹腔后，通过两个侧切口，不通过套管针，插入腹腔镜剪刀和防止损伤性镊子。

- 30 对腹膜或内表面的标准化损伤可以通过下述程序诱导，即在上述损伤前，应用镊子将右侧子宫角暴露 2 × 2 cm 区域 30 秒，在右侧子宫角末梢制备 1 cm 切口，将壁腹膜暴露 5 × 5 cm 区域。

在患者手术部位应用完整的鼠 LM 609 mAb 是可能的，但长期或多

次应用却应避免，以免激发宿主针对 LM 609 蛋白的免疫反应（即人类患者出现人抗鼠抗体 HAMA 反应；在其他治疗动物中，出现猫或狗抗鼠抗体和其他反应）。这种反应可以通过应用截短的 LM 609 得到部分抑制，所述截短的 LM 609 如 Fab, Fab2 或 Fv 构建物，或这些构建物的混合物。

5 抗体片段如 Fab, Fab2 或 Fv 的产生是本领域众所周知的，例如 French 所述(1998, Methods in Molecular Biology, Immunochemical Protocols, 2nd Ed., 80: 121-134)。其他已知方法还包括，应用重组 DNA 方法制备这些抗原结合蛋白和人工构建物（即单链 Fv, scFv, scAb; Molecular Recognition Units, MRUs）。例如见 Verhoeyen et al., “Advances in antibody engineering”
10 in Molecular Immunology, (IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 1996) chapter 7。

为了用于人类治疗，鼠 LM 609 抗体或其蛋白需要进行人源化处理，可以通过将蛋白结构的氨基酸残基进行明智取代以改变抗体表面的免疫原性抗原决定簇，使之作为治疗宿主的人类蛋白出现，但结合活性部位的抗原特异性，包括互补决定区（CDR）的氨基酸残基却保守，以维持
15 抗原决定簇的结合特异性。人源化处理单克隆抗体的方法已知，并在本领域业已有描述。例如，Waldmann et al.（美国专利 5,502,167）描述了一种人源化抗体，其中 CDRs 的氨基酸序列源于能够与静息和激活 T 细胞特异性结合的单克隆抗体的 CDRs 序列。Hoogenboom et al.（美国专利
20 5,565,332）描述了制备人源化特征增加了的抗体的方法，包括重链或轻链的选择性突变，重组突变链，然后用抗原筛选结合活性。Adair et al.,（美国专利 5,859,205）描述了将抗体重链和轻链 CDR 移植到受体框架区的特异性方法。因此，可以将编码活性部位形成残基的 LM 609 抗体的氨基酸残基移植到人类抗体框架中，因此可以创建一种嵌合抗体，具有
25 LM 609 的抗体结合特异性，同时其抗原特征类似人类抗体。进行 CDR 移植的最优化独特方法还包括链的再分类以及抗原筛选，业已在 WO99/29888（Barbas et al.）中有述。

该过程可能导致亲和力的不欲下降以及结合效率的下降，可以通过抗原筛选选择更优的结合构建物或通过生成多价结合构建物来使之最小
30 化。例如，应用本领域众所周知的化学接头交联两个或多个 LM 609 抗原结合活性部位或人源化处理活性部位也是有益的，这样可以形成双功能或多功能活性部位群，作为阻断剂可以更有效地发挥作用。同样，还可

以将多个活性部位粘附到固体支持物上，如微颗粒和较大的橡胶聚合物或胶质珠等。将完整的抗体或包括其活性部位的片段或构建物粘附到固体支持系统上是本领域已知的。例如，Wang (1998, Methods in Molecular Biology, Immunochemical Protocols, 2nd Ed., 80: 365-376) 描述了应用免疫磁珠进行细胞分类，其中磁珠业已包被了生物反应性分子，例如抗体、链霉亲和素、植物血凝素和肽。

可以通过生成干扰或者阻断 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白与纤连蛋白或其他细胞外基质蛋白结合的抗体使本发明方法得到实现或制备本发明等价组合物，进而干扰发生粘连所需的接触形成。为达到该目的，可以免疫适宜的动物，刺激与 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白或纤连蛋白或其他细胞外基质蛋白的 $\alpha v \beta 3$ 结合位点特异性结合的抗体的产生。应用本领域已知的常规方法，通过抗原筛选抗原选择这些适宜的抗体。从选出的适宜克隆中产生单克隆抗体的方法也是众所周知的，并可用来制备适宜的 $\alpha v \beta 3$ 抑制剂分子。

这些现存化合物的任意取代或随后产生的组合物中抗体或本发明方法也属于本发明范畴，在结果以及方法上是等价的。

除了本文描述的分子，其他适于抑制 $\alpha v \beta 3$ 结合的拮抗剂分子也可通过常规筛选方法容易地选择。为达到该目的，可以创建一种体外筛选试验，应用粘附于已经制备好细胞外基质上的细胞，所述细胞外基质包括纤连蛋白或其他适宜的基质组分。在初始筛选系统中，给予备选分子，然后为随后的细胞行为评分。底物结合的减少，或者伴随粘连形成发生基质组分增殖的抑制，提示该备选分子有希望进行进一步研究。初始筛选可以通过应用化合物的混合物进行来减少筛选时间和进行批量筛选的努力。一旦初始结果提示成功，就可对特定化合物混合物的特定结合抑制进行单独的筛选试验。如果需要，这些筛选试验可以完全通过全自动系统完成。无论这些抑制分子是如何发现的，可以想象，它们都将适宜地制备成本发明组合物，用于本发明方法。这些化合物的理想最佳应用浓度是至少能与 LM 609 抗体浓度相比，并使任意潜在副反应或毒性作用最小化。

能够与细胞外基质蛋白分子的 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白结合位点特异性结合或干扰其结合的拮抗剂分子也适用于本发明实践。

本发明和多个实施方案通过下述实施例阐述。

实施例

表 II. 粘连评分

处理	评分
对照	0 0 1
盐水	4 4 4 0 3 4
抗 b1	4 3 2 3 4 2
LM609	1 2 2 0 1 3

5 根据本文的描述, 本发明 (业已全面描述了很多方面并在文中要求保护) 无需过多实验即可进行和实施。尽管本发明的组合物和方法是通过上述实施例的方式描述的, 应该指出, 在不背离本发明概念、精神和范畴的条件下, 可以对本文描述的组合物和方法进行多种改良和修饰。