

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：A611 8582

※ 申請日期：A6.5.74

※IPC 分類：C07K 16/18
C07K 16/28
A61K 39/395
A61P 35/00

一、發明名稱：(中文/英文)

具有降低免疫性之高親和力人類及人類化抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素功能阻斷抗體

HIGH AFFINITY HUMAN AND HUMANIZED ANTI- $\alpha 5\beta 1$ INTEGRIN
FUNCTION BLOCKING ANTIBODIES WITH REDUCED
IMMUNOGENICITY

二、申請人：(共 2 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 德商拜耳先靈製藥公司
BAYER SCHERING PHARMA AG

2. 德商莫菲西斯公司
MORPHOSYS AG

代表人：(中文/英文)

1. 克羅斯
KLOSE
諾艾斯克-約翰布魯特
NOESKE-JUNGBLUT

2. 賽門 摩洛尼
MORONEY, SIMON

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 德國柏林市木勒街178號
178 MULLERSTRASSE D-13342 BERLIN, GERMANY

2. 德國馬丁史瑞市雷那克里斯街48號
LENA-CHRIST-STRASSE 48, D-82152 MARTINSRIED,
GERMANY

國籍：(中文/英文)

1. 德國 GERMANY

2. 德國 GERMANY

三、發明人：（共 8 人）

姓 名：（中文/英文）

1. 安卓斯 曼瑞德
MENRAD, ANDREAS
2. 喬治 威魯達
WILLUDA, JOERG
3. 克勞斯 伯斯利特
BOSSLET, KLAUS
4. 戴爾特 周帕夫
ZOPF, DIETER
5. 漢克 皮楚爾
PETRUL, HEIKE
6. 史戴芬 史提爾
STEIDL, STEFAN
7. 喬瑟夫 普萊斯勒
PRASSLER, JOSEF
8. 可瑞尼 皮提特 佛萊瑞
PETIT-FRERE, CORINNE

國 籍：（中文/英文）

1. 德國 GERMANY
2. 德國 GERMANY
3. 德國 GERMANY
4. 德國 GERMANY
5. 德國 GERMANY
6. 德國 GERMANY
7. 德國 GERMANY
8. 法國 FRANCE

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 歐洲專利機構；2006 年 05 月 24 日；06010779.4

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於以高親和力與 $\alpha 5\beta 1$ 整合素結合且具有阻斷功能之重組人類或人類化多肽。此外，揭示該等多肽之診斷學及醫藥學應用。

【先前技術】

血管生成係自預存在血管發展新血管之過程。新血管之生長促進胚胎發育、癒傷及雌性生殖週期。其在實體癌症及其他例如血管瘤、糖尿病性視網膜病、年齡相關之黃斑退化、牛皮癬、類風濕性關節炎及可能的骨關節炎及發炎性腸道疾病之病理發展中亦起重要作用(1)。

缺氧腫瘤組織釋放之生長因子刺激新血管生長。儘管生長因子及其受體在血管生成萌發中起關鍵作用，但黏附至胞外基質(ECM)亦為血管生成之引發調節劑。黏附促進內皮細胞存活以及內皮增生及遷移(2-5)。一種ECM蛋白質，尤其纖維結合蛋白，其表現於臨時(腫瘤)基質中且向血管細胞提供增生信號(2, 3)。顯然，無纖維結合蛋白之小鼠在包括不恰當形成之維管結構之許多缺陷的發展中過早死亡(6, 7)。

實驗動物模型及突變小鼠研究指示作為纖維結合蛋白之最重要受體的 $\alpha 5\beta 1$ 整合素在調節血管生成中起關鍵作用。胚胎缺失此整合素誘導早期及致死間質異常，其包括出現維管結構之組織缺陷(8, 9)及內皮細胞活體外形成血管樣結構之能力的缺陷(10, 11)。

$\alpha 5\beta 1$ 整合素之表現與血管生成特異相關：其在靜止內皮中不可偵測，但回應血管生成生長因子活體外表現(3, 4)或活體內表現於生長腫瘤之血管生成維管結構中(12, 20, 21)。

Kim等人(3)可證明小鼠抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素功能阻斷抗體IIA1抑制生長因子誘導之瘤血管生成與活體內腫瘤血管生成。當此整合素受到拮抗時轉導之信號研究指示未接合之受體活化PKA，其隨後活化卡斯蛋白酶3及8且誘導細胞凋亡(2, 13)。

已嘗試製備小鼠抗體IIA1之人類化衍生物(BD Pharmingen 目錄號555614)。因此產生稱為M200之82%人類/18%小鼠嵌合IgG4單株抗體。此外，已產生稱為F200之M200之單價Fab片段，且其已於獼猴模型中成功測試黃斑退化。進一步嘗試製備M200之完全人類化抗體衍生物，然而導致急劇生物活性損失(14)。

目前已知的抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素之諸如M200或F200之抗體於人類藥物中之任何應用具有誘導人類患者之免疫原性人類抗嵌合抗體(HACA)反應之風險。因此，本發明之目標為提供與已存在嵌合抗體相比具有降低之免疫原性，而保留標靶特異性及高生物活性及親和力的人類抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體。

【發明內容】

根據本發明，藉由噬菌體呈現使用 $\alpha 5\beta 1$ 整合素轉染之細胞由HuCAL[®]-Gold抗體庫分離Fab形式之完全人類抗體。

此等抗體展示高活體外活性，而歸因於完全人類起點可預期人類患者低免疫原性。

因此，本發明之第一態樣為人類或人類化抗體或其抗原結合片段，其(i)以100 nM及較佳 ≤ 10 nM之親和力與 $\alpha 5\beta 1$ 整合素結合；且(ii)抑制表現 $\alpha 5\beta 1$ 整合素之細胞與其受體活體外及活體內黏附。

本發明之多肽為人類或人類化抗體或其抗原結合片段。根據本發明術語"人類抗體"係關於具有實質上人類或完全人類可變域及(若存在)人類恆定域之抗體分子。如本申請案所用術語"人類"係關於可於個別人類中或藉由使用由其而得到的一致序列形成之序列，例如如以下文獻之對應概略中所描述，Kabat等人(1991), Sequences of Proteins of immunological Interest, 第五版，NIH Publication第91-3242號，US Department of Health and Human Services, Washington, DC，其以引入的方式併入本文中。術語"實質上人類"係指如Kabat等人所描述高達1、2、3、4或5個胺基酸不同於"全部人類"序列之序列。更特定言之，本發明之抗體或抗體片段包含重(H)及輕(L)免疫球蛋白鏈之實質上或完全人類可變框架區域。在本發明之意義上術語"人類化抗體"係關於具有實質上鼠類或完全鼠類可變域及人類或實質上人類恆定域，且其為 $>82\%$ 、較佳至少 90% 且尤其較佳至少 98% 人類之抗體分子。如本申請案所用術語"鼠類"係關於可於個別齧齒動物中或藉由使用由其而得之一致序列形成的序列。術語"實質上鼠類"係指高達1、2、

3、4或5個胺基酸不同於"完全鼠類"序列之序列。抗體或其抗體片段較佳為IgG抗體，例如人類或人類化IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗體或其片段，例如Fab、Fab'或(Fab)₂片段。然而本發明亦係關於具有例如單鏈(sc)抗體或其片段(例如scFv片段)之人類序列之重組抗體。

本發明之抗體或抗體片段含有一或多種與 $\alpha 5\beta 1$ 整合素特异性相互作用之抗原結合位點。較佳藉由組合可變重鏈(VH)與可變輕鏈(VL)區域獲得此抗原結合特性。VH或VL區域包括框架區域(FR1、FR2、FR3及FR4)及抗原結合調節CDR區域(VH區域之H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3；及VL區域之L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3)。

本發明之人類或人類化抗體或抗體片段較佳對 $\alpha 5\beta 1$ 整合素具有對應於 K_D 值 ≤ 100 nM、較佳 ≤ 10 nM且最佳 ≤ 1 nM之親和力，其中如實例中所述藉由FACS滴定 $\alpha 5\beta 1$ 陽性人類HUVEC細胞或藉由競爭BIAcore或競爭ELISA量測來測定親和力。

此外，本發明之多肽抑制如實例中所述表現 $\alpha 5\beta 1$ 整合素之人類腫瘤細胞之黏附，該腫瘤細胞例如由Lozzio等人(1979), Leukemia Research, 3: 363-370活體外研究之K562細胞(ATCC寄存編號：CCL-243)。抗體或抗體片段較佳在 ≤ 10 nM且較佳 ≤ 5 nM之濃度(IC₅₀)展示50%細胞黏附抑制作用。

此外，本發明之多肽較佳能夠誘導HUVEC細胞之卡斯卡蛋白酶活性。關於HUVEC生存力之IC₅₀值較佳 ≤ 10 nM、

更佳 ≤ 5 nM，其中如實例中所述測定該IC₅₀值(50%生存力)。

此外，本發明之多肽、抗體及抗體片段較佳可用於診斷且用於預防及治療腫瘤及癌症，尤其結腸癌。

該等多肽、抗體及抗體片段可與可偵測標記基團結合，諸如放射性、NMR、染料、酶及螢光標記基團。放射性基團可為例如I¹²⁵、I¹³¹或Y⁹⁰。

本發明之抗體或抗體片段較佳包含：

(a) VH區域，其選自

(i) 胺基酸序列SEQ ID NO: 1(MOR04624)、SEQ ID NO: 3(MOR04055)或該等VH區域之一之至少一H-CDR1、H-CDR2及/或H-CDR3區域；或

(ii) 藉由更改至少一個H-CDR區域獲自(i)之序列的胺基酸序列；及/或

(b) VL區域，其選自

(i) 胺基酸序列SEQ ID NO: 2(MOR04624)、SEQ ID NO: 4(MOR04055)或該等VL區域之一之至少一L-CDR1、L-CDR2及/或L-CDR3區域；或

(ii) 藉由至少一個L-CDR區域獲自(i)之序列的胺基酸序列。

尤其較佳為包含藉由使H-CDR2區域隨機化而自如上所述(a)(i)之VH區域獲得的VH區域之抗體或抗體片段。

在另一尤其較佳實施例中，抗體或抗體片段包含如上所述藉由使L-CDR3區域隨機化而自(b)(i)之VL區域獲得的VL

區域。

在另一尤其較佳實施例中，抗體或抗體片段包含藉由使抗體鏈改組而自(a)(i)之VH區域及/或(b)(i)之VL區域獲得的VH及/或VL區域。

藉由蛋白質工程化方法以人類CDR清單分別交換H-CDR2及L-CDR3產生H-CDR2及L-CDR3之子庫(17)。

例如，抗體或抗體片段包含自如SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2(MOR04624)中所述之VL及/或VH區域獲得的VH及/或VL區域。尤其較佳為包含以下之多肽：

- (a) 選自胺基酸序列SEQ ID NO: 5(MOR04971)、SEQ ID NO: 7(MOR04974)、SEQ ID NO: 9(MOR04975)、SEQ ID NO: 11(MOR04977)及SEQ ID NO: 11(MOR04985)之VH區域，或該等VH區域之至少一H-CDR1、H-CDR2及/或H-CDR3區域；及/或
- (b) 選自胺基酸序列SEQ ID NO: 6(MOR04971)、SEQ ID NO: 8(MOR04974)、SEQ ID NO: 10(MOR04975)、SEQ ID NO: 12(MOR04977)及SEQ ID NO: 14(MOR04985)之VL區域，或該VL區域之至少一L-CDR1、L-CDR2及/或L-CDR3區域。

本發明之多肽之特定實例如下：

包含SEQ ID NO: 1之VH區域及SEQ ID NO: 2(MOR04624)之VL區域，或其至少一H-CDR1、H-CDR-2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2或L-CDR3區域的抗體或抗體片段。

包含SEQ ID NO: 3之VH區域及SEQ ID NO: 4(MOR04055)

之VL區域，或其至少一H-CDR1、H-CDR-2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2或L-CDR3區域的抗體或抗體片段。

包含SEQ ID NO: 5之VH區域及SEQ ID NO: 6(MOR04971)之VL區域，或其至少一H-CDR1、H-CDR-2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2或L-CDR3區域的抗體或抗體片段。

包含SEQ ID NO: 7之VH區域及SEQ ID NO: 8(MOR04974)之VL區域，或其至少一H-CDR1、H-CDR-2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2或L-CDR3區域的抗體或抗體片段。

包含SEQ ID NO: 9之VH區域及SEQ ID NO: 10(MOR04975)之VL區域，或其至少一H-CDR1、H-CDR-2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2或L-CDR3區域的抗體或抗體片段。

包含SEQ ID NO: 11之VH區域及SEQ ID NO: 12(MOR04977)之VL區域，或其至少一H-CDR1、H-CDR-2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2或L-CDR3區域的抗體或抗體片段。

包含SEQ ID NO: 13之VH區域及SEQ ID NO: 14(MOR04985)之VL區域，或其至少一H-CDR1、H-CDR-2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2或L-CDR3區域的抗體或抗體片段。

本發明亦係指針對與上文所述之較佳及/或例示性抗體或抗體片段相同的抗原之抗原決定基之抗體或抗體片段。

該多肽之VH及VL鏈包含下列區域：

MOR04624、MOR04055及衍生物之VH鏈(編號方案根據(17))：

- 框架1區域自胺基酸1延伸至30aa；
- CDR1區域自胺基酸31延伸至35 aa；

- 框架2區域自胺基酸36延伸至49aa；
- CDR2區域自胺基酸50延伸至65aa；
- 框架3區域自胺基酸66延伸至94aa；
- CDR3區域自胺基酸95延伸至102aa；
- 框架4區域自胺基酸103延伸至113aa；

MOR04624及衍生物之VL_K1鏈(編號方案根據(17))：

- 框架1區域自胺基酸1延伸至23aa；
- CDR1區域自胺基酸24延伸至35aa；
- 框架2區域自胺基酸36延伸至50aa；
- CDR2區域自胺基酸51延伸至57aa；
- 框架3區域自胺基酸59延伸至89aa；
- CDR3區域自胺基酸90延伸至98aa；
- 框架4區域自胺基酸99延伸至109aa；

MOR04055及衍生物之VL_K1鏈(編號方案根據(17))：

- 框架1區域自胺基酸1延伸至23aa；
- CDR1區域自胺基酸24延伸至35aa；
- 框架2區域自胺基酸36延伸至50aa；
- CDR2區域自胺基酸51延伸至57aa；
- 框架3區域自胺基酸58延伸至89aa；
- CDR3區域自胺基酸90延伸至98aa；
- 框架4區域自胺基酸99延伸至109aa；

可藉由交換一或多個胺基酸，例如1、2、3、4或5個胺基酸來改變VH及/或VL鏈之框架區域。例如，MOR04624家族之成員的VL_K1鏈之框架3區域可改變。Fab序列之位

置 85 的胺基酸較佳可交換，其中纈胺酸(MOR04624，MOR04985)交換為蘇胺酸(MOR04974，75，77)尤其較佳。此外，VH鏈之框架1區域可改變。在一較佳實施例中，各VH-Fab序列之位置3的胺基酸可交換。尤其較佳為麩胺醯胺(q)交換為麩胺酸(e)，其可發生在(例如)選殖期間。

本發明之多肽適於治療或診斷應用，例如對於活體外或活體內診斷應用。

對於治療應用，抗體或抗體片段可原態使用。或者，多肽可呈與治療劑之結合物形式，該治療劑選自(例如)放射治療劑或化學治療劑，例如低分子量或生物細胞生長抑制劑或細胞毒性劑。治療劑可根據已知方法，較佳經由與多肽之反應性胺基、羧基、羥基及/或巰基之共價鍵，視情況使用均或雜二官能鍵聯劑與抗體或抗體片段結合。

在另一實施例中，多肽可呈包含抗體或抗體片段域及異源性融合域之融合蛋白質形式，該異源性融合域例如細胞激素諸如IL-2、IL-12或TNF- α 。本發明抗體或抗體片段之其他治療相關融合搭配物包含工程化之用於增加或降低免疫效應細胞募集之IgG Fc部分、諸如RNA酶或ETA之蛋白質毒素、諸如美登素(maytansine)或奧瑞他汀(auristatin)衍生物之小型藥物分子、用於活化前藥之酶、與其他整合素功能阻斷拮抗劑之融合蛋白質，或與具有抗血管生成活性之酶的融合蛋白質，諸如MMP-2或MMP-9(15)。此外，融合蛋白質可呈包含至少一如上所述之 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素結合域及

另一抗原之特異性結合域的雙特異性抗體形式。例如，第二抗原結合域可針對診斷及/或治療放射性核苷酸(例如 α 、 β 或 γ 放射性核素，諸如 ^{90}Y)之螯合劑、診斷NIR(近紅外)染料、治療活性染料、免疫學效應細胞(例如NK細胞、細胞毒性T細胞或NK T細胞)上之表面分子、功能阻斷抗VEGF結合域及功能阻斷結合域抗VEGF受體1、2及3，及諸如介白素之細胞激素。

對於診斷應用，多肽可呈與可偵測標記基團之結合物的形式，例如用於活體外或活體內診斷應用之標記基團。例如，可偵測標記基團可選自放射性、NMR、染料、酶及螢光(例如NIR螢光)標記基團。

對於治療應用，多肽較佳經調配成可另外包含其他活性成份及/或醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及/或佐劑的醫藥組合物。該醫藥組合物包含治療活性劑量之活性劑，其可由熟習此項技術者根據標準方法，藉由例如活體外實驗或於動物模型中確定。該組合物較佳藉由輸注、注射或吸入投與。根據病症之類型及嚴重程度及待治療患者之體質確定活性成份之劑量。較佳以若干劑量經至少2-4週之時間投與治療組合物。在此上下文中，提及如Ferrara等人，Nature Reviews Drug Discovery，第3卷，2004年五月，391-400；及Salgaller，Current Opinion in Molecular Therapeutics，2003，5 (6)，657-667中所述用於投與抗體或抗體結合物之已知方案，或提及用於投與如利妥昔單抗(Rituximab)、坎帕斯(Campath)、英利昔單抗(Remicade)等

之醫藥抗體的方案。

此外，本發明係關於包含如上所述作為診斷試劑之抗體或抗體片段的診斷組合物。該診斷組合物可包含其他診斷可接受之試劑、載劑、稀釋劑及/或佐劑。該診斷組合物包含於個別檢定形式中、例如於活體內或活體外診斷檢定形式中足以容許診斷偵測之量的多肽。

該組合物可用於 $\alpha 5\beta 1$ 整合素相關病症之治療或診斷應用中。例如，此等病症可為過度增生病症，例如與血管生成及/或轉移相關之病症，尤其癌症。藉由本發明之組合物可治療之癌症尤其包含各種實體腫瘤，例如結腸癌、腎癌、肺癌、前列腺癌、乳癌、腦癌、胃癌、肝癌或皮膚癌。或者，組合物可用於治療與血管生成相關之血液學癌症。與新血管生成相關之其他病症包含(但不限於)子宮內膜異位、血管瘤、類風濕性關節炎、骨關節炎、血管硬化性斑塊、發炎性腸道疾病、發炎性CNS疾病、牛皮癬、諸如糖尿病性視網膜病或年齡相關黃斑疾病之眼睛病症，及肥厚性瘢痕。在一較佳實施例中，該組合物之抗血管生成活性與生長因子無關。

該組合物可包含一或若干抗體或抗體片段，例如結合 $\alpha 5\beta 1$ 整合素之不同域的抗體或抗體片段之組合。該組合物亦可含有用於組合療法之小分子藥物。該組合物適於人類及獸醫學應用。尤其較佳為人類藥物應用。

此外，本發明係關於編碼如上所述抗體或抗體片段或融合多肽之核酸。核酸可為例如單鏈或雙鏈DNA或RNA。核

酸較佳與表現控制序列操作連接，其容許於適當宿主細胞或宿主生物體中表現。核酸可存在於可引入宿主細胞或宿主生物體中之載體或載體系統(亦即複數個載體)上。該載體可為適用於原核細胞之原核載體，例如質體或噬菌體。此外，載體可為真核宿主細胞或宿主生物體之真核載體，例如質體、人工染色體或病毒載體。適當載體描述於(例如) Sambrook 等人(1989), *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 及 Ausubel 等人(1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons 中。

本發明亦係指例如原核細胞或真核細胞(諸如人類細胞)之細胞，其經如上所述之核酸或載體轉型。此外，本發明係關於非人生物體，例如轉基因動物，諸如轉基因非人類哺乳動物，其經如上所述之核酸或載體轉型。術語"轉型"包括向細胞或生物體引入外來核酸之所有方法，包括轉染或感染。

可如上所述藉由在多肽表現且所表現之多肽自(例如)細胞、培養基、生物體或生物體之排泄產物回收的條件下培養細胞或非人生物體來製備多肽。

【實施方式】

進一步於實例中說明本發明。然而下列實例不應理解為限制。

實例

1. 產生功能阻斷抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體

1.1 篩選策略

小鼠單株抗體IIA1與僅存在於活化之活(內皮)細胞上之 $\alpha 5\beta 1$ 整合素之構型抗原決定基結合。為涵蓋選擇性及功能活性，確立由交替淘選分離之抗原及抗原表現細胞與功能細胞基篩選檢定組成之篩選路徑，以鑑別呈Fab形式之HuCAL[®] GOLD衍生之引導候選抗體：

1. 藉由噬菌體呈現使用HuCAL[®]-Gold庫(MorphoSys)選擇結合Fab抗體片段之抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素。對分離之抗原及抗原表現細胞進行淘選實驗。基於最佳抗體株之胺基酸序列，藉由VL-CDR3或VH-CDR2之隨機化使用人類CDR序列產生子庫，且在進一步淘選實驗中甚至自其中選擇高級結合劑。藉由選殖在1個抗體分子中含有所關注之VL-CDR3及VH-CDR2之輕及重鏈之組合獲得其他株("X選殖")。

2. 富集Fab抗體之篩選進行如下。測試所有淘選結合劑之對 $\alpha 5\beta 1$ 整合素陽性及 $\alpha 5\beta 1$ 整合素陰性細胞之ELISA結合。隨後在FACS實驗中進一步分析ELISA陽性株對 $\alpha 5$ 過渡表現細胞及 $\alpha 5$ 陰性細胞之細胞結合。隨後在功能檢定中分析適當株之i)與纖維結合蛋白之細胞黏附；ii)HUVEC(人類臍靜脈內皮細胞)及/或HDMVEC(人類皮膚血管內皮細胞)之細胞凋亡之誘導；iii)參比抗體IIA1之親和力量測及FACS競爭檢定；及iv)物種交叉反應性。

1.2 工具產生及檢定開發

$\alpha 5$ 整合素鏈cDNA

人類 $\alpha 5$ 鏈之cDNA購自RZPD(IMAGE-ID 6821577)且根據

標準方法選殖於pcDNA3表現載體(INVITROGEN)中。

純化之整合素受體

清潔劑溶解之人類整合素受體 $\alpha 5\beta 1$ (Chemicon CC1052)及 $\alpha 3\beta 1$ (Chemicon CC1092)購自CHEMICON INTERNATIONAL (Temecula, CA, USA)。對於固相噬菌體呈現、ELISA及BiaCore檢定，藉由非變性SDS-PAGE選擇具有至少90%之純度的整合素批次。

細胞株

人類慢性骨髓性白血病細胞株K562(ATCC寄存編號：CCL-243)與纖維結合蛋白之黏附僅由 $\alpha 5\beta 1$ 整合素介導(16)。此細胞株用於纖維結合蛋白介導之黏附檢定中以用於初始功能篩選。藉由FACS分析使用抗體IIA1檢測來證明 $\alpha 5\beta 1$ 整合素之存在(圖1A)。

分化細胞淘選策略之先決條件為模型系統，其中所關注之標靶在靶向陰性細胞株上過渡表現。出於此目的，選擇人類結腸癌細胞株HT29(ATCC寄存編號：HTB-38)，其表現 $\beta 1$ 整合素鏈但不表現 $\alpha 5$ -鏈(圖1B)。使用脂質胺(Lipofectamine)根據製造商之說明，將 $\alpha 5$ 鏈之互補DNA轉染於親本HT29-細胞中。藉由FACS篩選使用小鼠單株抗體IIA1以特異性標記表面表現之 $\alpha 5\beta 1$ 整合素來選擇穩定 $\alpha 5$ 過渡表現株(圖1C)。

黏附檢定

使用僅表現人類 $\alpha 5\beta 1$ 整合素之K562細胞株確立用於功能篩選之敏感性黏附檢定。出於此目的，以1 $\mu\text{g/ml}$ 人類纖維

結合蛋白或BSA作為非黏附基質來塗佈96孔平板以測定檢定之整體背景。由於整合素與ECM分子之黏附依賴於 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 之存在，因此使用10 mM EDTA來測定纖維結合蛋白獨立於整合素之背景結合。功能阻斷抗體IIA1用作參比且未阻斷抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素小鼠單株抗體(VC5)充當陰性抗體對照。如所預期，EDTA、IIA1(5 $\mu\text{g/ml}$)及BSA塗層抑制K562介導之黏附之結合，而VC5(5 $\mu\text{g/ml}$)並不干預細胞黏附(圖2)。

1.3 抗體噬菌體呈現及淘選策略

以HuCAL[®]-GOLD庫根據文獻(17-20)中描述之方案進行用於鑑定完全人類抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體之抗體噬菌體呈現。應用下列淘選策略且並行運作(表1)：

淘選子碼	第一輪	第二輪	第三輪
1298.1-3	$\alpha 5\beta 1$ 整合素固相	$\alpha 5\beta 1$ 整合素固相	$\alpha 5\beta 1$ 整合素固相
1298.4-6	$\alpha 5\beta 1$ 整合素固相	K562細胞	$\alpha 5\beta 1$ 整合素固相
1299.1-3	K562細胞	$\alpha 5\beta 1$ 整合素固相	K562細胞
1321.1-3	$\alpha 5\beta 1$ 整合素固相	HT29 $\alpha 5$ 細胞	$\alpha 5\beta 1$ 整合素固相
1322.1-3	HT29 $\alpha 5$ 細胞 p.a. HT29wt	$\alpha 5\beta 1$ 整合素固相	HT29 $\alpha 5$ 細胞
1322.4-6	HT29 $\alpha 5$ 細胞 p.a. HT29wt	HT29 $\alpha 5$ 細胞 p.a. HT29wt	HT29 $\alpha 5$ 細胞
1324.1-3	HDMVEC	$\alpha 5\beta 1$ 整合素固相	HDMVEC
1369.1-2	$\alpha 5\beta 1$ 整合素固相	HT29 $\alpha 5$ 細胞 p.a. HT29wt	$\alpha 5\beta 1$ 整合素固相
1371.1-2	HT29 $\alpha 5$ 細胞 p.a. HT29wt	$\alpha 5\beta 1$ 整合素固相	HT29 $\alpha 5$ 細胞 p.a. HT29wt

表1：概述淘選方法

p.a：以HT29wt吸附(以降低非特異性細胞表面結合)後

結果：

在淘選1298-1324期間，篩選數千株。儘管應用各種顯示策略，屢次分離出一在ELISA及FACS中具有選擇性之株(MOR04055)。除明顯結合優勢免疫抗原決定基之MOR04055外，確定出4種其他株(MOR04139、04141、04160、04568)。為進一步增加選擇更多種且更具特異性之整合素結合劑的機會，進行2種其他淘選(1369.1-2及1371.1-2)。此處，在噬菌體呈現期間添加10 µg/ml MOR04055-Fab以抑制優勢株MOR04055之富集。儘管Fab競爭，遍及淘選1369發現所有特異性結合劑再次為MOR04055。在淘選1371中，鑑定出一種其他個別結合劑(MOR04624)。

1.4 功能測試Fab抗體

黏附檢定

根據功能阻斷效能於預篩選實驗中將由第一淘選方法獲得之抗體排列如下：MOR04624>MOR04055>MOR04141=MOR04568=MOR04160。MOR04139稍微受抑但未達到50%抑制。K562黏附檢定中不同濃度抗體之劑量依賴型再測試證實預篩選實驗之結果，一例外為：MOR04139並未展示任何劑量依賴型抑制。不再進一步研究此抗體(圖3)。

誘導細胞凋亡

進一步評估由第一淘選方法獲得之抗體的細胞凋亡誘導特性。因此，在37°C下以0.2及0.4 µg/ml纖維結合蛋白將96孔平板塗佈1小時，且以2% BSA阻斷。將 1×10^4 HUVEC細胞與相應抗體一起在不含血清之用於內皮細胞培養之介質

中培育 (Gibco)。18 小時後，根據製造商描述之程序 (Caspase Glo 3/7 ; Promega) 將卡斯蛋白酶 3/7 檢定套組用於細胞溶解及卡斯蛋白酶活性之量化。單價 Fab MOR04055 及 04624 以 100 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度於 HUVEC 細胞中如二價參比 IgG IIA1 在 10 $\mu\text{g/ml}$ 般強烈地誘導卡斯蛋白酶 3/7 活性 (圖 4)。在此檢定中所有其他 Fab 為陰性。

藉由 FACS 滴定量測親和力

為分析原生 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素之結合效能，藉由 FACS 滴定測試 $\alpha 5 \beta 1$ 陽性 HUVEC 細胞上的所有抗體 (表 2)。MOR04055 具有最高結合親和力 (0.9 nM) 且展示二聚 IgG 形式增加。對於 MOR04624，發現單價 Fab 之低奈莫耳範圍之 KD 及二聚 IgG KD 之增加。

MOR	KD(nM)單價Fab	KD IgG
04055	0.9	0.5
04139	無rel.擬合	n.d.
04624	7.5	3.1
IgG IIA1	-	0.6/1.0

表 2：藉由 FACS 滴定單價 Fab 及 IgG 之親和力測定結果

Fab 及 IIA1 之競爭 FACS

為研究 Fab 抗體是否與 IIA1 共有或未共有相同抗原決定基，僅以 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Fab 或連同 10 $\mu\text{g/ml}$ IIA1 一起培育 HT29 $\alpha 5$ 細胞。以用於 FACS 分析之山羊抗人類 Fab 特異性 PE 結合物偵測與細胞結合之人類 Fab。圖 7 展示僅 Fab 染色 (黑線) 與 Fab + IIA1 (綠線) 之交疊。因此，添加 IIA1 使得 MOR04624 染色強度明顯降低。所有其他 Fab 未受 IIA1 影

響。此結果指示 IIA1 與 MOR04624 彼此競爭與相同或覆蓋型抗原決定基結合，而其他 4 個 Fab 與無關抗原決定基結合。

1.5 親和力成熟作用：分析 Fab 及 IgG 抗體

Fab MOR04055 及 04624 經受一輪親和力成熟。因此，藉由使 VL-CDR3 或 VH-CDR2 隨機化自親本 Fab 建構子庫 (17)，且在純化之 $\alpha 5 \beta 1$ 及 HT29 $\alpha 5$ 細胞上使其經受噬菌體呈現選擇。在黏附檢定中於 HT29 $\alpha 5$ 細胞上進一步分析此篩選之陽性結合劑，且根據其抑制活性排列。發現 MOR04624 之衍生物具有最佳抑制潛能。MOR04055、MOR04568、MOR04141 之衍生物僅展示中等或未展示顯著抑制提高。基於此等株之輕及重鏈，選殖 VL-CDR3 與 VH-CDR2 之 12 種新組合以進一步優化 (所謂的 "X 選殖")。表現最佳抑制株及來自 X 選殖之株且純化且活體外比較以便鑑定最終 7 種具有改良之功能阻斷活性的固結獨特結合劑以用於進一步深入分析 (MOR04971、72、74、75、77、85、87)。

誘導細胞凋亡

藉由卡斯蛋白酶活性及細胞存活率量測對 HUVEC 細胞之活體外細胞凋亡誘導 (圖 6 及圖 7)。兩種檢定中，單價 Fab MOR04974、04975 及 04977 之功效與二價小鼠單株參比抗體 IIA1 可比。

	IC ₅₀ (μ g/ml)	IC ₅₀ (nM)
IIA1	0.05	0.3
MOR04624	11.25	225.0
MOR04985	0.09	1.8
MOR04987	0.12	2.4
MOR04977	0.09	1.9
MOR04975	0.09	1.8
MOR04974	0.06	1.2
MOR04055	1.87	37.3
MOR04971	0.21	4.3
MOR04972	0.67	13.3

表3：XTT增生檢定中Fab抗體之IC₅₀值

與親本Fab相比，親和力成熟抗體顯著改良(高達190之因子)。單價Fab之增生抑制功效比二價參比抗體IIA1小4倍。

免疫沈澱

為證明Fab抗體之特異性，以與磁性Dyna珠粒耦合之Fab培育表面生物素化HT29 α 5及HT29wt細胞之NP-40胞溶物。IIA1用作參比抗體。加強洗滌後，在還原條件下使沈澱於SDS-PAGE樣品緩衝液中沸騰，轉漬至PVDF膜且以抗生蛋白鏈菌素(streptavidine)-AP探測。所有抗 α 5 β 1整合素抗體均使對應於預期分子量之整合素鏈 α 5及 β 1之約135 kDa之蛋白質雙重k帶特異性地沈澱(圖11)且HT29wt細胞溶胞物中未發現此情形。IIA1發現相同雙帶。不相關Fab MOR03207用作負對照且其並不使此雙帶沈澱。此結果證明Fab抗體之高特異性。

於HUVEC黏附檢定中優化IgG

為研究上文描述之Fab抗體之活體外效能以二聚形式是

否進一步提高，根據標準技術使用MorphoSys HuCAL IgG載體套組(MorphoSys AG, Munich; Germany)將抗體轉化為全部IgG1分子，且藉由HUVEC黏附檢定(圖8)、HUVEC生存力檢定(圖9)及HUVEC細胞凋亡檢定(圖10)與參比抗體IIA1相比較進行分析。

最重要地，IIA1作為參考點包括於全部實驗中。在此方面，MOR04974、75及77之IgG轉化得到與IIA1具有極相似 IC_{50} 之HuCAL IgG，指示與單價Fab形式相比轉化實際上導致約2倍增加。

於HUVEC生存力檢定中優化IgG

觀察到IgG轉化後，與Fab形式相比，5種結合劑具有約2倍增加之 IC_{50} 值。在降低HUVEC生存力中，MOR04974、75及77展示與參比IgG IIA1極相似的功效。

於HUVEC細胞凋亡檢定中優化IgG

自卡斯蛋白酶3、7檢定中引導IgG之分析可推斷出MOR04974、75及77誘導與參比抗體IIA1十分相當之細胞凋亡。

1.6 深入分析親和力優化之抗整合素IgG抗體

親和力優化之抗整合素抗體之特異性

藉由FACS分析HT29wt對HT29 α 5細胞，測試IgG1形式之親和力成熟抗體之結合特異性。HT29wt為 α 5陰性但含有 β 1整合素鏈。如螢光位移(圖12)所指示，IgG1抗整合素抗體及參比抗體IIA1特異性地識別HT29 α 5但非HT29wt細胞。非特異性抗體同型對照並不與細胞結合且所量測螢光

中未觀察到位移。該等實驗證明主要候選抗體特異性地識別 $\alpha 5$ 整合素且以如參比抗體IIA1般相同的特異性來結合。親和力成熟且再選殖入IgG形式後，抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體之抗原決定基特異性保留

FACS競爭實驗展示Fab抗體MOR04624及其衍生物與參比抗體IIA1競爭與覆蓋型抗原決定基之結合。轉化成IgG1形式後，再次測試抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體與IIA1之結合競爭。IgG1抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體MOR04974、75、77、85及MOR04624與HT29 $\alpha 5$ 細胞之結合使得螢光移動，當以IIA1預培養細胞時其完全受抑。此結果證實IIA1與IgG1抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體之抗原決定基競爭(圖13)。

抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素IgG1抗體於管形成血管生成檢定中之定性分析

認為新形成血管由活化內皮細胞之阻斷為抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體之關鍵抑制活性之一。對於全面表徵，與參比抗體IIA1相比較，在HUVEC管形成檢定中分析親和力優化之IgG1抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體。

在此檢定中，將 2×10^4 人類內皮靜脈臍細胞(HUVECs #2519, Promocell)接種於EBM-2介質(Clonetics #CC3156)中富含生長因子之Matrigel(Becton Dickinson #354234)上。15分鐘以後添加抗體(6 nM、3 nM、600 pM、300 pM、60 pM)且在37°C使管形成18-24 h。隨後將細胞固定及以抗CD31染色以用於照片證明管形成。

孔中所形成複合網之視覺分析揭示所有具有與參比抗體

相似之效能的MOR04624衍生之抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體之管形成阻斷活性(圖14)。在高濃度下，亦發現人類及鼠類IgG1同型對照之管形成之抗體阻斷。然而在低抗體濃度(下降至300 pM)下，觀察到管形成僅在以特異抗體處理之孔中阻斷，但在未處理孔或以抗體同型對照處理或弱功能阻斷抗體MOR04624處理之孔中未阻斷的活性窗。

於遷移檢定中分析抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素IgG抗體

血管生成過程中，活化之內皮細胞在主要由纖維結合蛋白(FN)組成之血管生成特異性臨時基質上向血管生成刺激物遷移。在跨孔遷移檢定中分析優化之抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素IgG抗體，且發現所有抗 $\alpha 5\beta 1$ 抗體以與IIA1相同數量級之功效(1-10 $\mu\text{g/ml}$)的 $\alpha 5\beta 1$ 纖維結合蛋白依賴型HUVEC遷移之阻斷活性。

抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體之反應性

對腫瘤及內皮細胞株之反應性

藉由FACS結合實驗對各種內皮及腫瘤細胞株測試抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體之反應性(表4)。觀察到除已知為 $\alpha 5$ 鏈陰性之HT29wt細胞外與所有測試內皮及腫瘤細胞株之結合。與參比抗體IIA1相比，引導候選抗體同樣與所有測試細胞株結合且所得螢光位移與所有抗體相似。同型對照抗體並未結合。總而言之，抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體在FACS細胞結合實驗中展示相當於IIA1之反應性。

細胞株	組織	抗-αVβ3	抗-αVβ5	抗-α5β1*						
				VC5	IIA1	MOR04974	MOR04975	MOR04977	MOR04985	MOR04624
HDMVEC	人類皮膚微脈管內皮細胞	+	-	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
HMEC	人類乳房上皮細胞 (epithel)				+++	+++				
HPAEC	人類肺動脈內皮				+++	+++				
HUVEC	人類臍靜脈內皮細胞	++	+	+++	+++	+++				
MS-1	小鼠胰腺內皮				-					
PAEC	豬主動脈內皮細胞	-	+	+++	-					
hTumorend	人類腫瘤內皮				++	+++	+++	+++	+++	+++
A375	惡性黑色素瘤				+	++	++	++	+/-	+
A549	人類肺癌				++	+++	+++	+++	+++	++
Colo205	人類腺癌	-	-	++	++	++	++	++	++	++
DU145	人類前列腺癌				+++	+++	+++	+++	+++	+++
HCT116	結腸直腸癌				+	++	++	++	+/-	+
HT-1080	纖維肉瘤				++	+++	+++	+++	+	+++
MCF-7	人類乳癌	+/-	++	+	+	+	+	+	+	+
MDA-MB-231	人類乳房癌	++	++	+++	++/+++	++	++	++	+	++
PC-3	人類前列腺腺癌	+	+	++	++					
U251	人類惡性膠質瘤	+	+	++	++	++	++	++	++	++
HT29	人類腺癌	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-
HT29α5	以α5鏈轉染之HT29				+++	+++	+++	+++	+++	+++

表 4：抗 α 5 β 1整合素抗體對各種細胞株之FACS反應性。+ =弱移動，++強移動，+++極強移動(2對數螢光)；*作為抗體對照之mIgG1及huIgG1用作標準對照且結合為陰性；抗體材料：抗人類CD51/61 chemicon #CBL 544；抗 α V β 5 chemicon #Mab 20192；非功能封阻 α 5 β 1整合素抗體 VC5 Pharmingen #555650；抗 α 5 β 1整合素抗體 IIA1 Pharmingen #55561。

抗 $\alpha 5\beta 1$ 抗體對正常及腫瘤組織切片之反應性-免疫組織化學

在免疫組織化學實驗中對不同組織切片分析親和力優化之抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體，且抗整合素抗體對個別組織之特異反應性概況極其類似於IIA1染色。總而言之，推斷出抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體展示與IIA1相當之染色圖案(圖16)。

活體內表徵親和力優化之抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素IgG抗體異種移植裸鼠中活體內靶向之證明

在具有HT29 $\alpha 5$ 細胞之異種移植物的裸鼠中比較與IIA1相比優化之抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體的活體內靶向特性。

以碘125根據碘化法根據標準程序進行優化之抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體(IgG4-Pro)之放射性標記，歷時1分鐘。在細胞結合檢定("Lindmo檢定")中量測免疫反應性。在4°C以增加數目(0.25至10 Mio)之 $\alpha 5\beta 1$ 整合素陽性細胞將50 ng放射性標記之抗體培育2 h。隨後洗滌細胞且在閃爍計數器中測定結合放射活性。將總計數/結合計數之商相對於1/細胞數作圖，且以非線性回歸模型擬合數據。自與y軸之交點計算無限抗原密度之剩餘免疫反應性且對於所有抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體而言發現其為75-80%。

除MOR04975在48小時後迅速下降至72 h後小於5% ID/g外，對於所有分析之抗體而言，自24小時人類抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體以>10%ID/g累積至HT29 $\alpha 5$ 異種移植物，持續96小時。48小時後MOR04974以18% ID/g達到其峰值，且72 h後MOR04977以18% ID/g達到其峰值。相比較而言，鼠類IIA1抗體自24 h在HT29 $\alpha 5$ 異種移植物上以>10%ID/g累積，

持續高達96 h。對於非特異性抗溶菌酶抗體MOR03207而言，發現任何時間點均小於3%ID/g。自此等結果，可推斷 $\alpha 5\beta 1$ 陽性HT29 $\alpha 5$ 異種移植物之特異靶向。抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體MOR04974及MOR04977之活體內靶向與IIA1類似且在單一時間點，甚至更優。

抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體自血管生成替代動物模型之活體內功效

一如參比抗體IIA1，抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體不會與小鼠及大鼠 $\alpha 5\beta 1$ 整合素交叉反應。因此在動物模型中分析活體內治療效能且證明特異性活體內抗血管生成作用係具有難度的，且必須在血管生成之替代模型中進行。

已在血管生成之3D活體內球狀體替代模型中進行抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素IgG抗體與IIA1之活體內比較(圖18)。

對於此模型，將規定內皮細胞數目之球狀體與允許在24孔平板中聚合之膠原蛋白混合。隨後將在matrigel栓塞中含有VEGF及FGF2之EC球狀體皮下植入SCID小鼠中，其中所刺激之EC形成與小鼠維管結構交織之人類毛細管之複合三維網路。抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體(200 μ g)每週給予兩次，歷時3週。在第21天終止研究，移除matrigel栓塞並檢查血管密度。至於參比抗體IIA1，以優化之抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素IgG抗體MOR04974及MOR04975處理，以每平方毫米2至約20個微管之因子降低matrigel栓塞中之微管密度，而以不相關人類抗溶菌酶抗體MOR03277處理，以使得每平方毫米降低約40個微管。

基於此結果，可推斷出優化之人類抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體

MOR04974及MOR04975在血管生成之3D活體內球狀體替代模型中具有與IIA1可比之活體內抗血管生成功效。

結論：

在活體外實驗中，發現MOR04974、75、77之Fab以及IgG1形式之最佳抑制特性具有一致性。所有3種IgG與參比mAb IIA1相當。此等結合劑係MOR04624之衍生物。在活體內實驗中，證明完全人類及優化之IgG MOR04974、75、77在裸鼠及血管生成之3D球狀體模型中可有效地靶向腫瘤異種移植物，MOR04974及MOR04975如參比抗體IIA1般有效。

上述抗體之V鏈的胺基酸序列展示於表4中：

親本MOR04624

最終hIgG1 κ	VH-h-IgG1-載體	VL-h-κ-載體
MOR04974	MOR04985	MOR04990
MOR04975	MOR04985	MOR04991
MOR04977	MOR04987	MOR04989
MOR04985	MOR04985	MOR04624

MOR04624

VLκ (SEQ ID NO: 1)

diqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgissnlwyyqqkpgkapklliyaasnlqsgpsrfsqsgsgtdftltisslq
pedfavyycqqysdqsytfqggtkveikrt

VH (SEQ ID NO: 2)

qvqlvesggglvqpqgslrlscaasgftfssygmwvrqapgkglewvssisysdsntyyadsvkgrftisrdns
kntlylqmnsiraedtavyycargldyghhhglsqgfdywgqgtltvss

MOR04055

VLλ3 (SEQ ID NO: 3)

dieltqppsvsvapqgtariscsgdsigeqyahwyqqkpgqapvlviyddnkrpsgiperfsgsngntatltis
gtqaedeaddyccsytlntasvfgggtklvtlg

VH3 (SEQ ID NO: 4)

qvqlvesggglvqpqgslrlscaasgftfsnyamnwvrqapgkglewvsrisysgsdtyyadsvkgrftisrdns
kntlylqmnsiraedtavyycaregfgfmystlvfdswgqgtltvss

MOR04971

VLΛ3 (SEQ ID NO: 5)

dieltqppsvsvapggqtariscsgdsigeqyahwyqqkpgqapvlviyddnkrpsgiperfsgsngntatlts
gtqaeadadyccssytsdasvfgggtklvtlg

VH3 (SEQ ID NO: 6)

qvqlvesggglvqpggslrlscaasgftfsnyamnwwrqapgkglewvsaihdnghyypdsvkgrftisrds
kntlylqmnsraedtavyycaregefymystlvfdswgqgtltvss**MOR04974**

VLk (SEQ ID NO: 7)

diqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgissnlwyyqqkpgkapklliyaasnlqsgpsrfsfgsgsgtdftltisslq
pedfatyyccqyasprqtfgggtkveikrt

VH (SEQ ID NO: 8)

qvqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssygmswvrqapgkglewvsirakqsgyatdyaapvkgrftisrd
nksntlylqmnsraedtavyycarglgdyghhhglsigifywgqgtltvss**MOR04975**

VLk (SEQ ID NO: 9)

diqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgissnlwyyqqkpgkapklliyaasnlqsgpsrfsfgsgsgtdftltisslq
pedfatyyccqyefgiqtfgggtkveikrt

VH (SEQ ID NO: 10)

qvqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssygmswvrqapgkglewvsirakqsgyatdyaapvkgrftisrd
nksntlylqmnsraedtavyycarglgdyghhhglsigifywgqgtltvss**MOR04977**

VLk (SEQ ID NO: 11)

diqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgissnlwyyqqkpgkapklliyaasnlqsgpsrfsfgsgsgtdftltisslq
pedfatyyccqyssnpqtfgggtkveikrt

VH (SEQ ID NO: 12)

qvqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssygmswvrqapgkglewvsfiepkwrggathyaasvkgrftisrd
nksntlylqmnsraedtavyycarglgdyghhhglsigifywgqgtltvss**MOR04985**

VLk (SEQ ID NO: 13)

diqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgissnlwyyqqkpgkapklliyaasnlqsgpsrfsfgsgsgtdftltisslq
pedfavyycqqysdqsytfgggtkveikrt

VH (SEQ ID NO: 14)

qvqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssygmswvrqapgkglewvsirakqsgyatdyaapvkgrftisrd
nksntlylqmnsraedtavyycarglgdyghhhglsigifywgqgtltvss

2. 結論：

抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素功能阻斷抗體僅以嵌合抗體形式可用。完全人類化之方法已失效。該等抗體於臨床環境中之應用可誘導人類患者之免疫反應。尤其對於長期應用抗血管生成化合物而言，此可導致增加之給藥或甚至可導致治療早期終止之嚴重副作用。

已鑑別具有優良生物概況之完全人類 $\alpha 5\beta 1$ 整合素功能阻斷抗體。歸因於保證在臨床環境中盡可能無副作用之完全人性，對於已存在鼠類及嵌合抗體係有利的。預期相對於此分子以嚴重副作用及/或增加之劑量誘導免疫反應的可能性較低。因此此等分子更適用於人用醫藥，例如對於治療實體腫瘤。

參考文獻：

- 1) Carmeliet P及Jain RK (2000) Nature 407: 249-257 ;
- 2) Kim S等人(2002) J Clin Invest 110: 933-941 ;
- 3) Kim S等人(2002) Am J Pathol 156: 1345-1362 ;
- 4) Kim S 等人(2002) J Biol Chem 275: 33920-33928 ;
- 5) Cheresh DA及Stupack DG (2002) Nat Med 8: 193-194 ;
- 6) George EL等人(1993) Development 119:1079-1091 ;
- 7) George EL等人(1997) Blood 90: 3073-3081 ;
- 8) Yang等人(1993) Development 119: 1093-1105 ;
- 9) Goh KL等人(1997) Development 124: 4309-4319 ;
- 10) Taverna D及Hynes RO (2001) Cancer Res 61: 5255-

5261 ;

- 11) Francis SE等人(2002) Artheroscler Thromb Vase Biol 22: 927-933 ;
- 12) McDonald D及 Choyke PL (2003) Nat Med 9: 713-725 ;
- 13) Bakre MM等人(2002) Nat Med 8: 995-1003 ;
- 14) Finck B (2004) SRI conference "Angiogenesis: New Opportunities And Solutions For Drug Development", Cambridge, MA ;
- 15) Symington BE (1989) J Biol Chem 264: 13258-13266 ;
- 16) Knappik A等人(2000) J Mol Biol 296: 57-86 ;
- 17) Krebs B等人(2001) J Immunol Methods 254: 67-84 ;
- 18) Rauchenberger R等人(2003) J Biol Chem 278: 38194-38205 ;
- 19) Lohning C, United States Patent 6,753,136 ;
- 20) Magnussen 等人 (2005) Cancer Research 65: 2712-2721 ;
- 21) Yao 等人(2006) Cancer Research 66: 2639-2649 。

【圖式簡單說明】

圖1 A：K562細胞之 $\alpha 5$ 表現的FACS分析：

以功能阻斷抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素小鼠單株抗體IIA1證明人類 $\alpha 5\beta 1$ 整合素於活K562細胞之細胞表面上的表現(14)。對於此目的，如MorphoSys提供之HuCAL[®] GOLD手冊中所描述使用標準FACS程序。

圖 1B：人類結腸癌細胞株 HT29 並未表現 $\alpha 5$ 整合素鏈。

FACS 分析證明 HT29 細胞並未表現 $\alpha 5$ 整合素鏈，而 $\beta 1$ 鏈以高密度存在於細胞表面上。為此，HT29 細胞極適於以 $\alpha 5$ 整合素鏈轉染。

圖 1C：以 $\alpha 5$ 整合素 cDNA 轉染後人類結腸癌細胞株 HT29 表現 $\alpha 5\beta 1$ 整合素。以 $\alpha 5$ 整合素鏈轉染後，藉由 FACS 分析使用功能阻斷小鼠抗人類 $\alpha 5\beta 1$ 整合素單株抗體 IIA1 作為參比，證明 $\alpha 5\beta 1$ 整合素在 HT29 $\alpha 5$ 細胞之表面上的同源表現。

圖 2：對 K562 細胞與纖維結合蛋白塗佈之培養平板黏附的抑制在功能阻斷 (IIA1) 或未阻斷 (VC5) 抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素小鼠單株抗體存在下，培育預加載鈣黃綠素之 K562 細胞。使用 10 mM EDTA 測定 K562 細胞與纖維結合蛋白之獨立於整合素之背景結合。在不支持 K562 細胞與培養平板之表面黏附的 BSA 阻斷孔中測定檢定之整體背景。將黏附細胞(洗滌後)溶解且測定螢光。

圖 3：Fab 介導之 K562 細胞對纖維結合蛋白之劑量依賴型抑制作用

測試抗人類 $\alpha 5\beta 1$ 特異性 Fab 抑制螢光染料負載之 K562 細胞與固定纖維結合蛋白之結合的能力。黏附後，將細胞溶解且作為黏附細胞之量測測定螢光。僅纖維結合蛋白指示最大黏附，而對 BSA 包覆之細胞測定檢定之整體背景。

圖 4：抗 $\alpha 5\beta 1$ 功能阻斷抗體誘導內皮細胞細胞凋亡。

使用 HUVEC 細胞於不含血清之內皮細胞介質中測定呈

單價形式之純化之Fab的卡斯蛋白酶3/7活化之誘導。使用市售化學發光檢定系統(Caspase Glo, PROMEGA)根據製造商之說明測定卡斯蛋白酶活性。

圖 5：Fab及IIA1之競爭FACS

FACS競爭指示MOR04624與HT29 α 5細胞上之參比抗體IIA1之抗原決定基競爭。可推斷兩種抗體共有類似抗原決定基，而所有其他Fab與 α 5 β 1整合素上之無關結合位點反應。(黑線-Fab結合，綠線-當與參比抗體IIA1競爭時之Fab結合)。

圖 6：親和力成熟抗 α 5 β 1功能阻斷抗體有力地誘導內皮細胞細胞凋亡

使用HUVEC細胞於不含血清之內皮細胞介質中測定呈單價形式之純化之Fab的卡斯蛋白酶3/7活化之誘導。使用市售化學發光檢定系統(Caspase Glo, PROMEGA)根據製造商之說明測定卡斯蛋白酶活性。

圖 7：親和力成熟抗 α 5 β 1功能阻斷Fab抗體抑制內皮細胞增生

在指示量之純化Fab或參比抗體IIA1存在下將黏附HUVEC細胞於不含血清之內皮細胞介質中培育48小時。以市售XTT檢定根據製造商之說明測定增生細胞。測定IC50值且概括於表4中。

圖 8：於HUVEC黏附檢定中優化IgG

藉由 α 5 β 1功能阻斷IgG抗體抑制HUVEC細胞與纖維結合蛋白之黏附。IgG MOR04974、MOR04975、MOR04977、

MOR04985以與IIA1類似之IC50值阻斷黏附。Fab向IgG之轉化導致約2倍增加。

圖 9：HUVEC生存力檢定-抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素IgG之分析

$\alpha 5\beta 1$ 功能阻斷IgG抗體抑制HUVEC細胞之生存力。將HUVEC細胞平皿接種於纖維結合蛋白塗佈之平板上，以增加濃度之IgG抗體培育且48 h後量測存活率。IgG MOR04974、MOR04975、MOR04977、MOR04985以與IIA1類似之IC50值阻斷黏附。Fab向IgG之轉化導致約2倍增加。

圖 10：抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素IgG之HUVEC卡斯蛋白酶檢定

使用HUVEC細胞於不含血清之內皮細胞介質中測定 $\alpha 5\beta 1$ 功能阻斷IgG抗體對卡斯蛋白酶3/7活化之誘導。使用市售化學發光檢定系統(Caspase Glo, PROMEGA)根據製造商之說明測定卡斯蛋白酶活性。MOR04974、MOR04975、MOR04977及MOR04985與參比抗體IIA1之活性相似。

圖 11：親和力成熟Fab特異性地使 $\alpha 5\beta 1$ 整合素自生物素化細胞溶胞物之表面沈澱

以與磁性Dyna珠粒偶合之Fab培育HT29 $\alpha 5$ 及HT29wt之表面生物素化NP40溶胞物。將免疫沈澱物轉移至PVDF薄膜且以鏈黴抗生素蛋白鹼性磷酸酶(AP)。所有Fab均特異性地使與參比抗體IIA1相當預期尺寸之蛋白質自HT29 $\alpha 5$ 溶胞物沈澱出，而HT29wt溶解物中無蛋白質可偵測到。不相關Fab MOR03207並未特異性地使任何蛋白質沈澱。

圖 12：抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素IgG(實例MOR04974)與HT29-wt及

HT29 α 5(FACS量測)之結合特異性

在 10 μ g/mL 以 5×10^5 HT29wt及 HT29 α 5細胞培育親和力成熟IgG抗體。以Cy3標記之二級抗體偵測特異性結合之抗體。上圖：以HT29wt(左)或HT29 α 5細胞(右)培育之IIA1，下圖：IgG1 MOR04974。螢光遷移指示與 α 5整合素特異性結合且發現MOR04975、MOR04977、MOR04985及MOR04624螢光遷移。抗體同型對照為陰性(黑線)。抗整合素抗體以與參比抗體IIA1相同之特異性與 α 5鏈轉染之細胞結合。

圖 13：HT29 α 5細胞上之抗 α 5 β 1整合素IgG(實例MOR04974)與IIA1之競爭結合(FACS量測)。抗 α 5 β 1整合素IgG與IIA1競爭覆蓋型抗原決定基。

在 1 μ g/mL 以 5×10^5 以 20 μ g/mL IIA1預培育或未預培育之HT29 α 5細胞培育內部產生之抗 α 5 β 1整合素抗體。藉由以山羊抗小鼠-FITC偵測來證明IIA1結合之存在(左圖)。藉由以山羊抗人類-FITC二級抗體偵測來展示人類抗體(MOR04974)之結合及競爭(右圖)。此實例展示MOR04974競爭。發現MOR04975、MOR04977、MOR04985、MOR04624具有相同結果。

圖 14：於管形成檢定(實例MOR04974)中分析IgG1抗 α 5 β 1整合素抗體。親和力優化之抗 α 5 β 1整合素IgG1抗體如IIA1般有效地阻斷管形成。

在 60-80% 融合收集早期傳代人類內皮靜脈臍細胞(HUVECs #2519)且將 2×10^4 細胞接種於 EBM-2 介質(Clonetics #CC3156)中含有Matrigel(Becton Dickinson

#354234)之孔中。15分鐘以後添加抗體，且在37°C使管形成進行18-24 h。隨後將細胞固定(4%福馬林)、滲透、阻斷且以抗CD31染色。以6 nM、3 nM、600 pM、300 pM及60 pM施加抗體。展示300 pM A：未處理樣品；B：人類IgG1抗溶菌酶MOR03207；C：IgG1 MOR04624；D：IgG1 MOR04974；E：IIA1；F：鼠類IgG1之作用的代表性影像。發現MOR04975及MOR04977亦具有相同結果。

圖 15：親和力優化之抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素IgG抗體於跨孔遷移檢定中之活性。

於96孔跨孔遷移微板(8 μ m孔，#351163 Falcon/BD)中，以纖維結合蛋白作為唯一刺激物進行遷移檢定。在37°C以2 μ g/mL纖維結合蛋白將fluoroblok膜之下側塗佈1 h且在37°C以2% BSA阻斷30分鐘。將含有0.1% BSA之不含人類內皮血清之介質(Invitrogen)在上部及下部腔室中用作遷移緩衝液。將抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體(0.6-10 μ g/mL)添加至各孔之上部腔室中，添加早期傳代HUVEC(2×10^4)且在37°C使細胞遷移4 h。隨後將膜下側之遷移細胞鈣黃綠素染色，且以Perkin Elmer1220 Victor計數器在485 nm激發及535 nm發射光測定所得螢光。A：在10 μ g/mL抗體濃度獲得所展示之影像。MOR04974、MOR04975、MOR04977如IIA1般有效地抑制HUVEC遷移。

B：MOR04974、75、77(IgG4-Pro抗體同型)之抗遷移活性之劑量-反應。IC₅₀(MOR04974：1 μ g/ml；MOR04975：1.5 μ g/ml；MOR04977：1 μ g/ml；IIA1：2 μ g/ml)

圖 16：結腸癌組織上親和力優化之IgG1抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體之IHC染色圖案。

在結腸癌之連續組織切片上滴定放大10倍之生物素化抗體。以鏈黴抗生素蛋白鹼性磷酸酶進行偵測。例如展示所獲得濃度為2.5 $\mu\text{g/mL}$ 之免疫組織化學切片。對於IIA1及MOR04974，發現小至中等尺寸血管及基質分隔之染色。黑色箭頭展示由2種抗體染色之相同血管。發現MOR04975及MOR04977具有類似染色圖案。藍色箭頭指示經染色之血管。可推斷優化之抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體展示與IIA1相當之染色圖案。

圖 17：親和力優化之抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體(IgG4-Pro)之腫瘤靶向。

以碘125放射性標記抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體(1分鐘，Iodogen方法)。經測定剩餘免疫反應性為75-80%，且將3 μg 標記之抗體注入HT29 $\alpha 5$ 異種移植裸鼠。

A：腫瘤吸收IgG1 MOR04974、MOR04975及對照(參比抗體IIA1及抗溶菌酶MOR03207)；B：腫瘤吸收IgG1 MOR04977及對照。

抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體之抗體吸收與IIA1類似，且顯著高於不相關IgG1 MOR03207。由此結果推斷出抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體可特異性地靶向 $\alpha 5\beta 1$ 整合素陽性HT29 $\alpha 5$ 異種移植。

圖 18：於血管生成之3D活體內球狀體替代模型中分析優化之抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素IgG抗體。

將含有規定內皮細胞數目之球狀體與VEGF及FGF2之

Matrigel 栓塞皮下植入 SCID 小鼠中。以優化之人類抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抗體及對照抗體治療後，分析具有小鼠維管結構之複合網路之 EC-萌發及血管形成。人類 IgG MOR04974 及 MOR04975 如 IIA1 般有效。

序列表

<110> 1.德商拜耳先靈製藥公司 2.德商莫菲西斯公司

<120> 具有降低免疫性之高親和力人類及人類化抗 $\alpha 5\beta 1$ 整合素功能阻斷抗體

<130> 53407AWO

<140> 096118587

<141> 2007-05-24

<150> EP06010779.4

<151> 2006-05-24

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(108)

<223> VLK

<400> 1

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asp Gln Ser Tyr Thr
85 90 95

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

<210> 2

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(126)

<223> VH

<400> 2

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Tyr Ser Asp Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

200817433

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

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 3

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(109)

<223> VL3

<400> 3

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Glu Gln Tyr Ala
20 25 30

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

Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Tyr Thr Leu Thr Asn Thr Ala
85 90 95

Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 4

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(124)

<223> VH3

<400> 4

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Glu Phe Gly Phe Met Tyr Ser Thr Leu Val Phe Asp
 100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 5

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(109)

<223> VL3

<400> 5

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Glu Gln Tyr Ala
 20 25 30

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

Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Tyr Ser Ser Asp Ala
 85 90 95

Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105

<210> 6

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(123)

<223> VH3

<400> 6

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

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

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

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

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

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

Arg Glu Gly Glu Phe Gly Phe Met Tyr Ser Thr Leu Val Phe Asp Ser
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(108)

<223> VLK

<400> 7

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Ser Pro Arg Gln Thr
85 90 95

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

<210> 8

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(128)

<223> VH

<400> 8

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

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

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

Ser Gly Ile Arg Ala Lys Gln Ser Gly Tyr Ala Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Gly Asp Tyr Gly His His His Gly Leu Ser

100

105

110

Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 9

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(108)

<223> VLK

<400> 9

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asn
 20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Phe Gly Ile Gln Thr
 85 90 95

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

<210> 10

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(128)

<223> VH

<400> 10

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

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

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

Ser Gly Ile Arg Ala Lys Gln Ser Gly Tyr Ala Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

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

Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(108)

<223> VLK

<400> 11

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asn
 20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Asn Pro Gln Thr
 85 90 95

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

<210> 12

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(128)

<223> VH

<400> 12

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

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

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

Ser Phe Ile Glu Pro Lys Trp Arg Gly Gly Ala Thr His Tyr Ala Ala
 50 55 60

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

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

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

Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 13

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(108)

<223> VLK

<400> 13

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asn
 20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asp Gln Ser Tyr Thr
85 90 95

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

<210> 14

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(128)

<223> VH

<400> 14

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

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

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

Ser Gly Ile Arg Ala Lys Gln Ser Gly Tyr Ala Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

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

200817433

Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

五、中文發明摘要：

本發明係關於與 $\alpha 5\beta 1$ 整合素結合的具有高親和力及阻斷功能之重組人類或人類化多肽。此外，揭示該等多肽之診斷及醫藥學應用。

六、英文發明摘要：

The present invention relates to recombinant human or humanized polypeptides which bind to $\alpha 5\beta 1$ integrin with high affinity and blocking function. Further, diagnostic and pharmaceutical applications of the polypeptides are disclosed.

十、申請專利範圍：

1. 一種人類或人類化抗體或其抗原結合片段，其以 ≤ 100 nM之親和力與 $\alpha 5\beta 1$ 整合素結合，且其在活體外及活體內可抑制表現 $\alpha 5\beta 1$ 整合素之細胞至其受體之黏附作用。
2. 如請求項1之抗體或片段，其以 ≤ 10 nM之親和力與 $\alpha 5\beta 1$ 整合素結合。
3. 如請求項1或2之抗體或抗體片段，其在活體外抑制K562細胞株之黏附作用。
4. 如請求項1至3中任一項之抗體或抗體片段，其包含：
 - (a) VH區域，其選自
 - (i) 胺基酸序列SEQ ID NO: 1(MOR04624)、SEQ ID NO: 3(MOR04055)或該等VH區域中之一者的至少一個H-CDR1、H-CDR2及/或H-CDR3區域；或
 - (ii) 藉由更改至少一個H-CDR區域而獲自(i)之序列的胺基酸序列；及/或
 - (b) VL區域，其選自
 - (i) 胺基酸序列SEQ ID NO: 2(MOR04624)、SEQ ID NO: 4(MOR04055)或該等VL區域中之一者的至少一個L-CDR1、L-CDR2及/或L-CDR3區域；或
 - (ii) 藉由更改至少一個L-CDR區域而獲自(i)之序列的胺基酸序列。
5. 如請求項4之抗體或抗體片段，其包含藉由使該H-CDR2區域隨機化而衍生自(a)(i)之VH區域的VH區域。
6. 如請求項4或5之抗體或抗體片段，其包含藉由使該L-

CDR3區域隨機化而衍生自(b)(i)之VL區域的VL區域。

7. 如請求項4至6中任一項之抗體或抗體片段，其包含藉由使抗體鏈改組而衍生自(a)(i)之VH區域及/或(b)(i)之VL區域的VH及/或VL區域。
8. 如請求項4至7中任一項之抗體或抗體片段，其包含：
 - (a) VH區域，其選自胺基酸序列SEQ ID NO: 5 (MOR04971)、SEQ ID NO: 7(MOR04974)、SEQ ID NO: 9(MOR04975)、SEQ ID NO: 11(MOR04977)及SEQ ID NO: 11(MOR04985)或該等VH區域之至少一個H-CDR1、H-CDR2及/或H-CDR3區域；及/或
 - (b) VL區域，其選自胺基酸序列SEQ ID NO: 6 (MOR04971)、SEQ ID NO: 8(MOR04974)、SEQ ID NO: 10(MOR04975)、SEQ ID NO: 12(MOR04977)及SEQ ID NO: 14(MOR04985)，或該等VL區域之至少一個L-CDR1、L-CDR2及/或L-CDR3區域。
9. 一種抗體或抗體片段，其包含SEQ ID NO: 1之VH區域及SEQ ID NO: 2(MOR04624)之VL區域，或其至少一個H-CDR1、H-CDR-2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2或L-CDR3區域。
10. 一種抗體或抗體片段，其包含SEQ ID NO: 3之VH區域及SEQ ID NO: 4(MOR04055)之VL區域，或其至少一個H-CDR1、H-CDR-2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2或L-CDR3區域。
11. 一種抗體或抗體片段，其包含SEQ ID NO: 5之VH區域及

SEQ ID NO : 6(MOR04971)之VL區域，或其至少一個H-CDR1、H-CDR-2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2或L-CDR3區域。

12. 一種抗體或抗體片段，其包含SEQ ID NO: 7之VH區域及SEQ ID NO: 8(MOR04974)之VL區域，或其至少一個H-CDR1、H-CDR-2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2或L-CDR3區域。

13. 一種抗體或抗體片段，其包含SEQ ID NO: 9之VH區域及SEQ ID NO: 10(MOR04975)之VL區域，或其至少一個H-CDR1、H-CDR-2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2或L-CDR3區域。

14. 一種抗體或抗體片段，其包含SEQ ID NO: 11之VH區域及SEQ ID NO: 12(MOR04977)之VL區域，或其至少一個H-CDR1、H-CDR-2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2或L-CDR3區域。

15. 一種抗體或抗體片段，其包含SEQ ID NO: 13之VH區域及SEQ ID NO: 14(MOR04985)之VL區域，或其至少一個H-CDR1、H-CDR-2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2或L-CDR3區域。

16. 如請求項1至15中任一項之抗體或抗體片段，其為IgG抗體，例如人類或人類化IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗體或其片段，例如Fab、Fab'或F(ab)₂片段。

17. 如請求項1至15中任一項之抗體或抗體片段，其為重組抗體，例如單鏈(sc)抗體，或其片段，例如sc Fv片段。

18. 如請求項1-17中任一項之抗體或抗體片段，其係以與治療劑之結合物形式呈現。
19. 如請求項18之抗體或抗體片段，其中該治療劑係選自放射治療劑及化學治療劑。
20. 如請求項19之抗體或抗體片段，其中該放射治療劑為 I^{125} 、 I^{131} 或 Y^{90} 。
21. 如請求項1-17中任一項之抗體或抗體片段，其係以融合多肽形式呈現。
22. 如請求項21之抗體或抗體片段，其為與細胞激素之融合多肽或為雙特異性抗體。
23. 如請求項1-17中任一項之抗體或抗體片段，其係以與可偵測標記基團之結合物形式呈現。
24. 如請求項23之抗體或抗體片段，其中該可偵測標記基團係選自放射性、NMR、染料、酶及螢光標記基團。
25. 如請求項24之抗體或抗體片段，其中該可偵測放射性標記基團係選自 I^{125} 、 I^{131} 或 Y^{90} 。
26. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至25中任一項之抗體或抗體片段作為活性劑。
27. 如請求項26之組合物，其用於預防或治療過度增生病症。
28. 如請求項26或27之組合物，其用於預防或治療癌症。
29. 如請求項26或27之組合物，其用於預防或治療結腸癌。
30. 如請求項26或27之組合物，其用於預防或治療腫瘤。
31. 一種診斷組合物，其包含如請求項1-17或23-24中任一項

之抗體或抗體片段作為診斷試劑。

32. 如請求項31之組合物，其用於診斷過度增生病症或具有該傾向病症。

33. 如請求項32之組合物，其用於診斷癌症或具有該傾向病症。

34. 如請求項26至33中任一項之組合物，其用於人用藥物。

35. 一種核酸，其編碼如請求項1至17或21至22中任一項之抗體或抗體片段。

36. 如請求項35之核酸，其與表現控制序列可操作地連接。

37. 一種載體或載體系統，其包含如請求項35或36之核酸。

38. 一種細胞，其係經如請求項35或36之核酸或如請求項37之載體轉型。

39. 一種非人類生物體，其係經如請求項35或36之核酸或如請求項37之載體轉型。

40. 一種用於製備如請求項1-17或21-22中任一項之多肽的方法，其中在該多肽得以表現且所表現之多肽得以回收的條件下培養如請求項38之細胞或如請求項39之非人類生物體。

41. 如請求項1至25中任一項之多肽的用途，其用於製造供預防或治療 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素相關病症或具有該傾向病症之藥劑。

42. 如請求項41之用途，其用於製造供預防或治療癌症之藥劑。

43. 如請求項1至25中任一項之多肽的用途，其用於製造供

診斷 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素相關病症或具有該傾向病症之試劑。

44. 如請求項43之用途，其用於製造供診斷癌症之試劑。

十一、圖式：

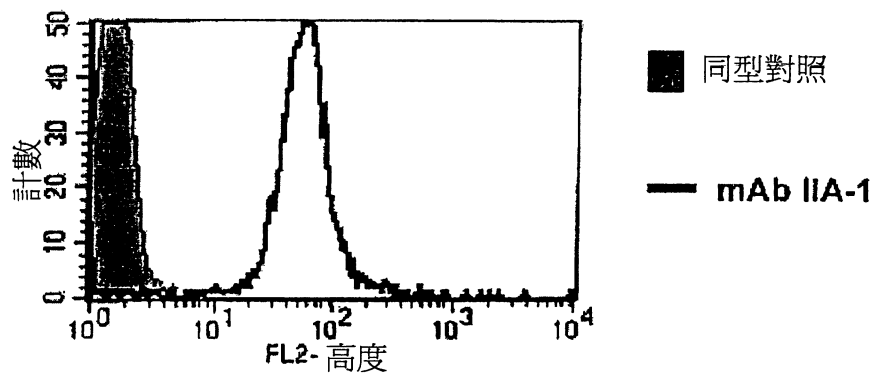


圖1A

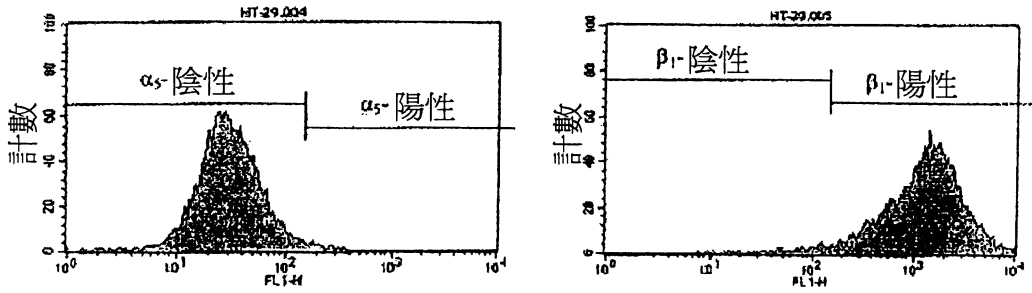


圖1B

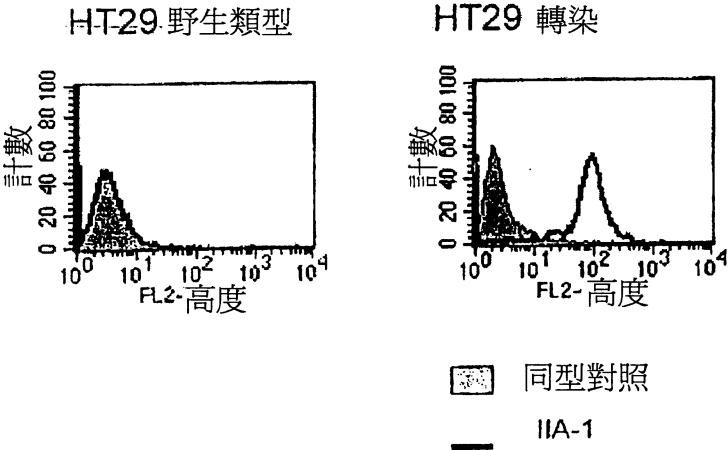


圖1C

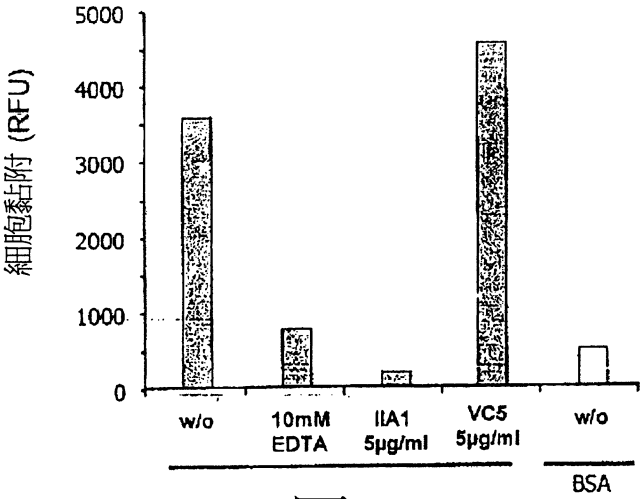


圖2

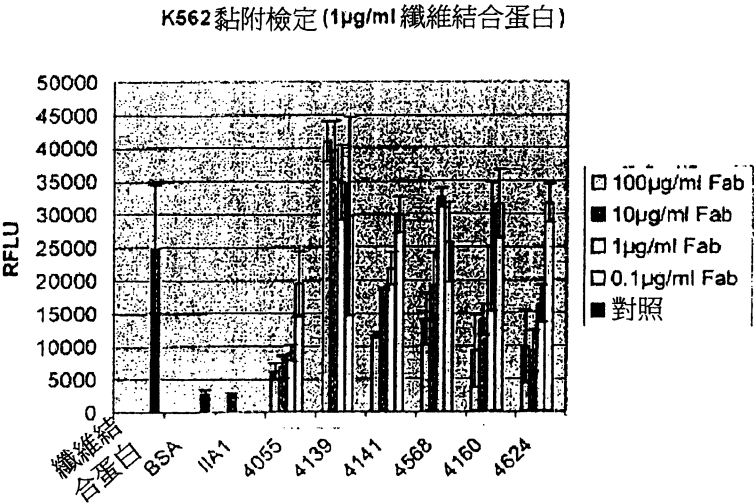


圖3

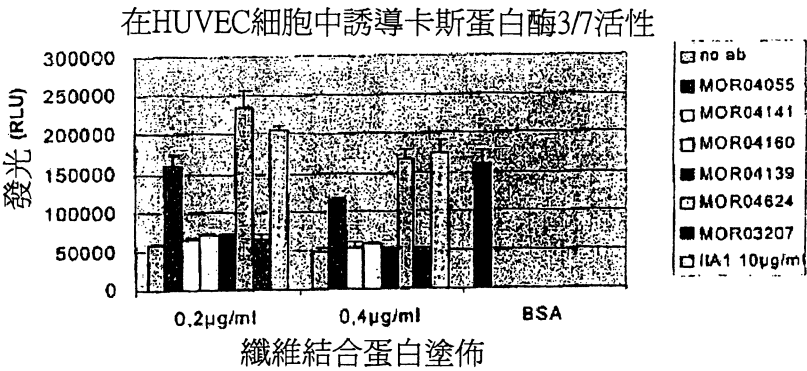


圖4

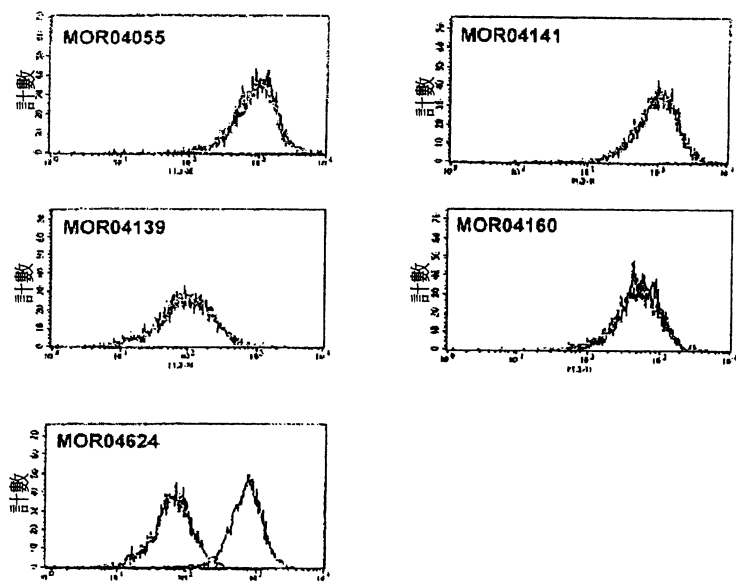


圖5



- 8 -

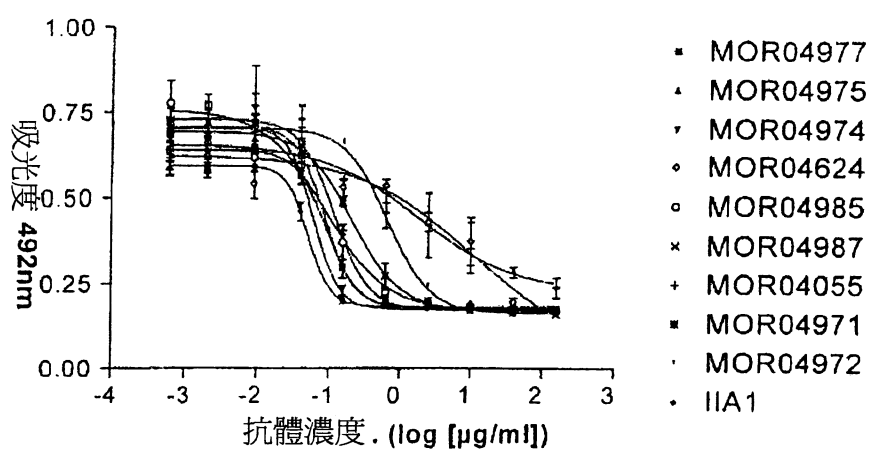


圖7

3CPF22黏附檢定引導整合素
IgGs

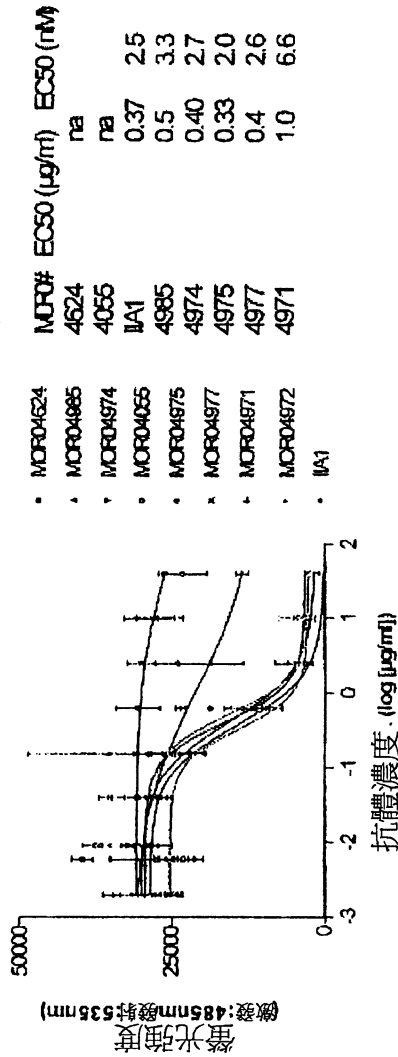


圖8

3CPF18生存力檢定引導整合素IgGs

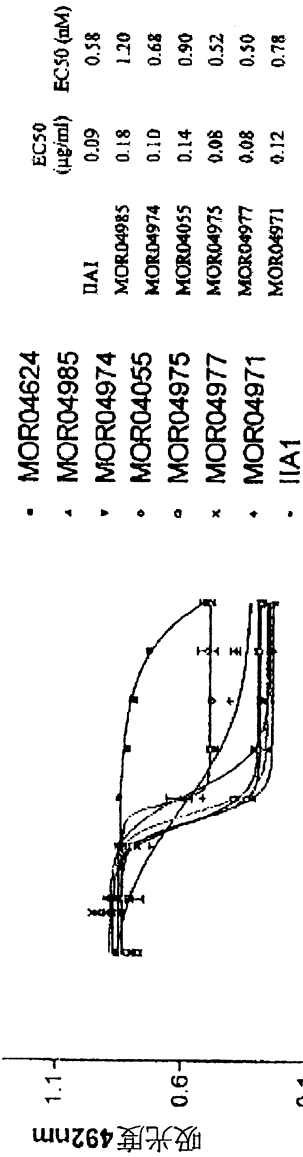


圖9

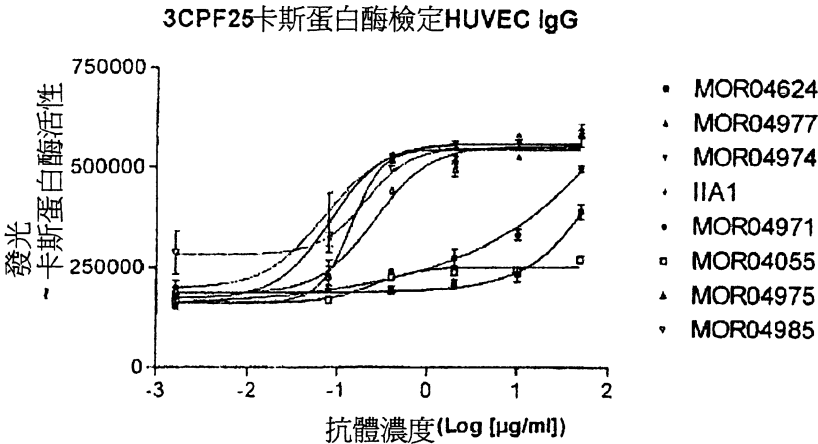


圖10

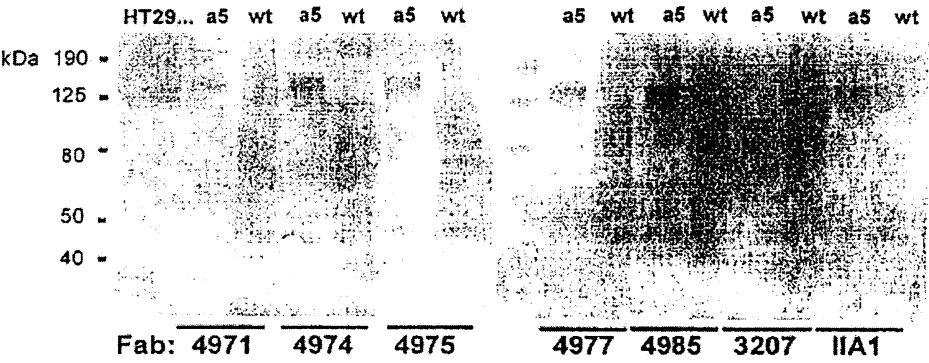


圖11

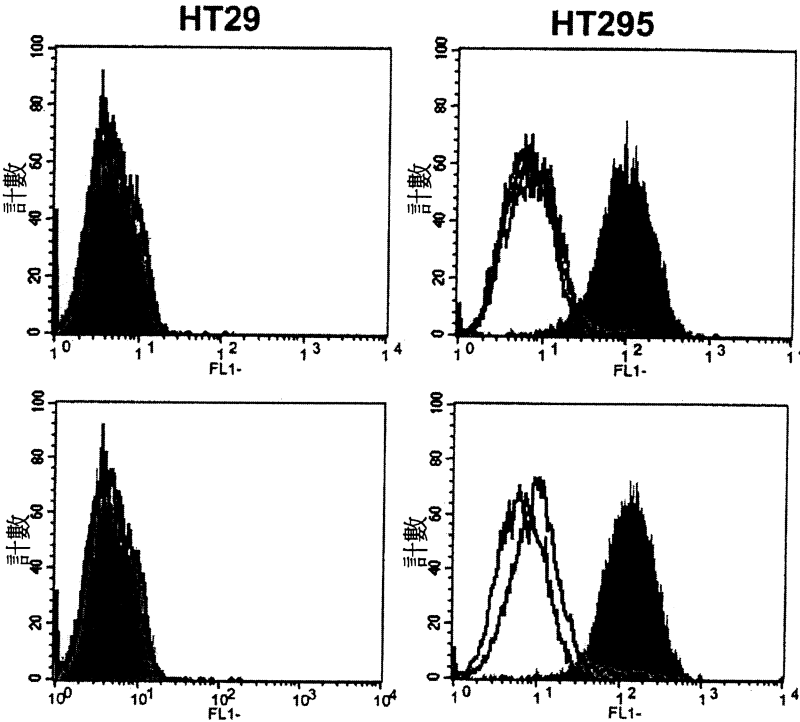


圖12

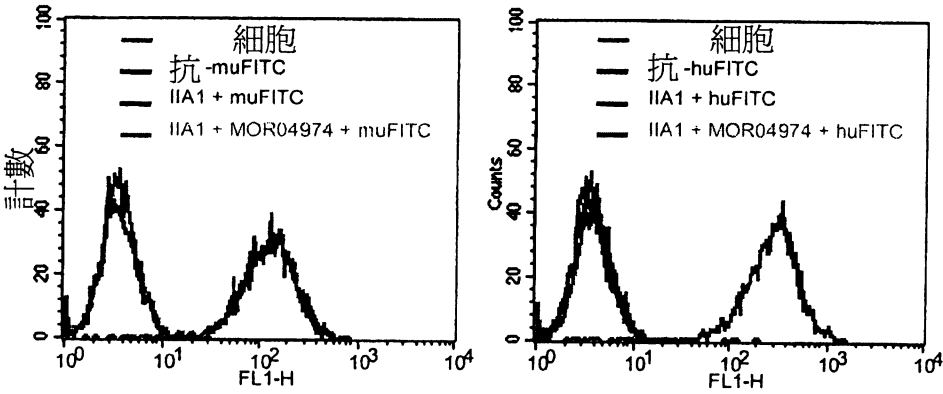


圖13

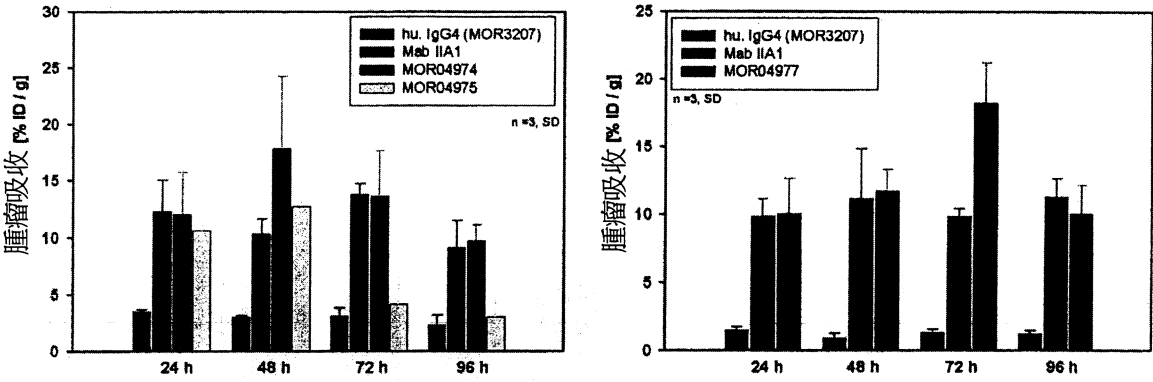


圖17

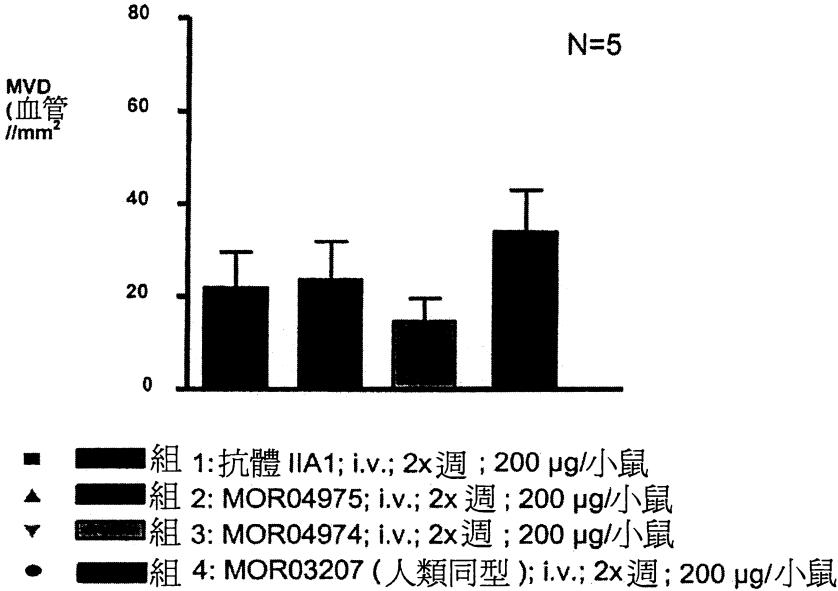


圖18

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)