



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106232625 B

(45)授权公告日 2020.04.24

(21)申请号 201480065738.4

C07K 16/32(2006.01)

(22)申请日 2014.10.01

A61P 35/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61K 39/00(2006.01)

申请公布号 CN 106232625 A

(56)对比文件

(43)申请公布日 2016.12.14

WO 2007008712 A2, 2007.01.18,

(30)优先权数据

CN 102924598 A, 2013.02.13,

61/885,302 2013.10.01 US

WO 2013123152 A2, 2013.08.22,

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

JOHN J. BARRON等.HER2 Testing and

2016.06.01

Subsequent Trastuzumab Treatment for
Breast Cancer in a Managed Care
Environment.《THE ONCOLOGIST》.THE
ONCOLOGIST EXPRESS, 2009, 第14卷(第18期), 第
760-768页.

(86)PCT国际申请的申请数据

Antonio Saha等.High-resolution in

PCT/EP2014/071028 2014.10.01

vivo imaging of breast cancer by
targeting the pro-invasive integrin $\alpha V \beta$
6.《Journal of Pathology》.Wiley
InterScience, 2010, 第222卷(第1期), 第52-63
页.

(87)PCT国际申请的公布数据

审查员 蒋超

W02015/049280 EN 2015.04.09

(73)专利权人 免疫医疗有限公司

地址 英国剑桥郡

(72)发明人 S.T.巴里 J.F.马夏尔 K.M.摩尔

权利要求书2页 说明书83页
序列表54页 附图33页

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 罗文锋 彭昶

(51)Int.Cl.

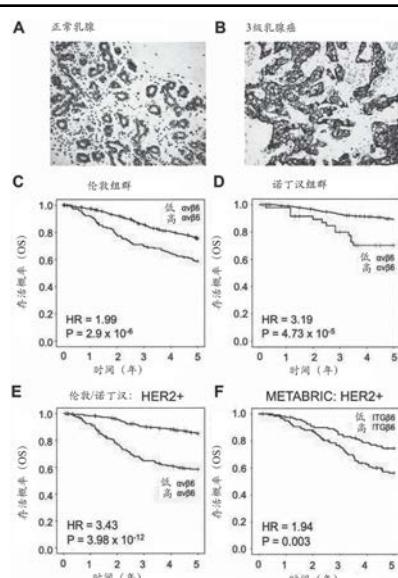
C07K 16/28(2006.01)

(54)发明名称

治疗和诊断过表达 $\alpha V \beta 6$ 的癌症的方法

(57)摘要

在一些方面中,本披露涉及治疗和诊断过表达 $\alpha V \beta 6$ 的癌症的方法。在一些实施例中,本披露涉及治疗和诊断过表达 $\alpha V \beta 6$ 和HER2的癌症的方法。在一些实施例中,采用组合疗法策略。



- a. $\alpha V\beta 6$ 抗体; 和
- b. HER2 抗体,

在制备用于治疗动物体内的恶性肿瘤的方法中的一种药物或多种药物中的用途,所述方法包括向对其有需要的所述动物给予治疗有效剂量的:

- a. $\alpha V\beta 6$ 抗体; 和
- b. HER2 抗体,

其中所述 $\alpha V\beta 6$ 抗体包含重链和轻链,其中所述 $\alpha V\beta 6$ 抗体重链可变区包含氨基酸序列 GGSISSGGYYWS 的 CDR1、氨基酸序列 YIYYSGRTYNNPSLKS 的 CDR2 和氨基酸序列 VATGRADYHFYAMDV 的 CDR3,以及其中所述 $\alpha V\beta 6$ 抗体轻链可变区包含氨基酸序列 SGDVLAKKSAR 的 CDR1、氨基酸序列 KDSERPS 的 CDR2 和氨基酸序列 YSAADNNLV 的 CDR3;且

其中所述 HER2 抗体为曲妥珠单抗,其中所述恶性肿瘤过表达 $\alpha V\beta 6$ 和 HER2。

2. a. $\alpha V\beta 6$ 抗体; 和
- b. HER2 抗体,

在制备用于抑制肿瘤细胞生长的方法的一种药物或多种药物中的用途,所述方法包括向所述肿瘤细胞给予治疗有效剂量的:

- a. $\alpha V\beta 6$ 抗体; 和
- b. HER2 抗体,

其中所述 $\alpha V\beta 6$ 抗体包含重链和轻链,其中所述 $\alpha V\beta 6$ 抗体重链可变区包含氨基酸序列 GGSISSGGYYWS 的 CDR1、氨基酸序列 YIYYSGRTYNNPSLKS 的 CDR2 和氨基酸序列 VATGRADYHFYAMDV 的 CDR3,且其中所述 $\alpha V\beta 6$ 抗体轻链可变区包含氨基酸序列 SGDVLAKKSAR 的 CDR1、氨基酸序列 KDSERPS 的 CDR2 和氨基酸序列 YSAADNNLV 的 CDR3;且

其中所述 HER2 抗体为曲妥珠单抗,其中所述肿瘤细胞过表达 $\alpha V\beta 6$ 和 HER2。

3. 如权利要求1或2所述的用途,其中同时给予所述 $\alpha V\beta 6$ 抗体和所述 HER2 抗体。

4. 如权利要求1或2所述的用途,其中顺序地给予所述 $\alpha V\beta 6$ 抗体和所述 HER2 抗体。

5. 如权利要求1或2所述的用途,其中所述恶性肿瘤或肿瘤细胞包括选自以下各项的肿瘤细胞:乳腺癌细胞、卵巢癌细胞、胰腺癌细胞、肺癌细胞、结直肠癌细胞、头颈癌细胞、食管癌细胞、胃癌细胞以及肝细胞癌细胞。

6. 如权利要求1所述的用途,其中所述动物是人。

7. 如权利要求5所述的用途,其中所述乳腺癌细胞或卵巢癌细胞对曲妥珠单抗治疗具有抗性。

8. 如权利要求1或2所述的用途,其中 $\alpha V\beta 6$ 、HER2 和 HER3 中至少一种的水平被下调。

9. 如权利要求1或2所述的用途,其中 $\alpha V\beta 6$ 和/或 HER2 的至少一种下游靶标的水平被下调。

10. 如权利要求1或2所述的用途,其中 Akt2 和 Smad2 中至少一种的水平被下调。

11. a. $\alpha V\beta 6$ 抗体; 和
- b. HER2 抗体,

在制备用于抑制抗曲妥珠单抗的肿瘤细胞的生长的方法中的一种药物或多种药物中的用途,所述方法包括向所述细胞给予治疗有效剂量的:

- a. $\alpha V\beta 6$ 抗体; 和

b. HER2抗体，

其中所述 $\alpha V\beta 6$ 抗体包含重链和轻链，其中所述 $\alpha V\beta 6$ 抗体重链可变区包含氨基酸序列GGSISSSGGYYWS的CDR1、氨基酸序列YIYYSGRTYNPNSLKS的CDR2和氨基酸序列VATGRADYHFYAMDV的CDR3，且其中所述 $\alpha V\beta 6$ 抗体轻链可变区包含氨基酸序列SGDVLAKKSAR的CDR1、氨基酸序列KDSERPS的CDR2和氨基酸序列YSAADNNLV的CDR3；且

其中所述HER2抗体为曲妥珠单抗，并且其中所述肿瘤细胞过表达 $\alpha V\beta 6$ 和HER2。

12. 如权利要求1-2、6-7和11中任一项所述的用途，其中所述 $\alpha V\beta 6$ 抗体是单克隆抗体。

13. 如权利要求1-2、6-7和11中任一项所述的用途，其中所述 $\alpha V\beta 6$ 抗体是全人单克隆抗体。

14. 如权利要求1-2、6-7和11中任一项所述的用途，其中所述 $\alpha V\beta 6$ 抗体抑制超过99%的TGF β -LAP介导的HT29细胞粘附。

15. 如权利要求1-2、6-7和11中任一项所述的用途，其中所述 $\alpha V\beta 6$ 抗体以小于0.070 μ g/ml的IC50抑制TGF β -LAP介导的HT29细胞粘附。

16. 如权利要求1-2、6-7和11中任一项所述的用途，其中所述 $\alpha V\beta 6$ 抗体以小于35纳摩尔(nM)的Kd结合 $\alpha V\beta 6$ 。

17. 如权利要求1-2、6-7和11中任一项所述的用途，其中所述 $\alpha V\beta 6$ 抗体以小于25纳摩尔(nM)的Kd结合 $\alpha V\beta 6$ 。

18. 如权利要求1-2、6-7和11中任一项所述的用途，其中所述 $\alpha V\beta 6$ 抗体以小于10纳摩尔(nM)的Kd结合 $\alpha V\beta 6$ 。

19. 如权利要求1-2、6-7和11中任一项所述的用途，其中所述 $\alpha V\beta 6$ 抗体以小于60皮摩尔(pM)的Kd结合 $\alpha V\beta 6$ 。

20. 如权利要求1-2、6-7和11中任一项所述的用途，其中所述 $\alpha V\beta 6$ 抗体包括具有SEQ ID NO.:75的序列的重链多肽和具有SEQ ID NO.:77的序列的轻链多肽。

治疗和诊断过表达 α -V- β -6的癌症的方法

[0001] 领域

[0002] 在一些方面中,本领域涉及治疗和诊断过表达 α V β 6的癌症的方法。在一些实施例中,本领域涉及治疗和诊断过表达 α V β 6和HER2的癌症的方法。在一些实施例中,采用组合疗法策略。

[0003] 背景

[0004] 一些最具攻击性和侵袭性的乳腺癌亚型是过表达人表皮生长因子受体2(HER2)的那些,所述受体是由HER1-HER4组成的受体的受体酪氨酸激酶家族的一员。HER2被过表达在25%-30%的乳腺癌中并且负责为乳腺癌细胞赋予更具侵袭性的表型,但是实际机制并不完全知晓。人源化抗体曲妥珠单抗(其阻断来自HER2的下游信号传导)的引入已经使得HER2阳性(HER2+)乳腺癌患者的复发和死亡率降低。遗憾的是,超过70%的患者从头便对曲妥珠单抗有抗性或对曲妥珠单抗产生抗性,从而没有为这些患者留下分子特异性治疗选择。因此,迫切需要为患有HER2+乳腺癌的女性鉴定出改进的疗法。

[0005] 几项研究已经暗示PI3K/Akt途径的调节异常是HER2+乳腺癌中的抗性机制。然而,Akt被牵涉在许多非癌相关途径中,因而抑制可能产生许多脱靶并潜在地产生不良效应,因此更具癌症特异性的靶标是令人希望的。因此,必须找到HER2实际上如何促进侵袭以及PI3K信号传导的上调如何促进曲妥珠单抗抗性的另外机制。

[0006] 整合素是胞外蛋白(包括一些细胞表面蛋白)的 $\alpha\beta$ 异源二聚体跨膜细胞表面受体。它们整合胞外环境与胞内细胞骨架和信号传导机器,从而传导调节细胞行为的时空消息。因此,整合素是大多数正常细胞过程(包括粘附、迁移、生长、存活和分化)的中心组分。整合素表达和或信号传导的调节异常通过不恰当地调节上述过程而且还介导侵袭和转移而与癌症的发展相关。整合素 α V β 6仅由上皮细胞进行表达,通常仅在经历组织重塑的细胞中可检测到,如在伤口愈合、发育、慢性炎症以及癌症中所发生的。然而,尚未阐明整合素(如 α V β 6)在某些癌症(尤其是乳腺癌)中的牵涉。

[0007] 概述

[0008] 目前已经显示, α V β 6在乳腺癌中可以促进更具攻击性的表型并且在一些实施例中为具有曲妥珠单抗抗性的患者提供了新颖的治疗靶标。

[0009] 因此,本发明的目的是检测并治疗对 α V β 6抑制敏感的癌细胞,包括但不限于乳腺癌和对曲妥珠单抗有抗性的乳腺癌。另外,本发明的目的是检测并治疗对 α V β 6和HER2两者的抑制敏感的癌细胞,包括但不限于乳腺癌和对曲妥珠单抗有抗性的乳腺癌。

[0010] 一个方面包括一种治疗动物体内的恶性肿瘤的方法,该方法包括向对其有需要的所述动物给予治疗有效剂量的:

[0011] a. α V β 6靶向结合剂,其特异地结合至 α V β 6并且抑制配体与 α V β 6的结合;和

[0012] b.任选地组合治疗剂。

[0013] 另一个方面包括一种抑制肿瘤细胞生长的方法,该方法包括向这些肿瘤细胞给予治疗有效剂量的:

[0014] a. α V β 6靶向结合剂,其特异地结合至 α V β 6并且抑制配体与 α V β 6的结合;和

- [0015] b. 任选地组合治疗剂。
- [0016] 再一个方面包括一种抑制抗曲妥珠单抗的肿瘤细胞生长的方法,该方法包括向所述细胞给予治疗有效剂量的:
- [0017] a. $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂,其特异性地结合至 $\alpha V\beta 6$ 并且抑制配体与 $\alpha V\beta 6$ 的结合;和
- [0018] b. HER2靶向结合剂,其特异性地结合至HER2并且抑制配体与HER2的结合。
- [0019] 又另一个方面包括一种诊断患者体内的对 $\alpha V\beta 6$ 和HER2抑制敏感的乳腺癌的方法,该方法包括通过测量 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的表达水平来分析患者样品中过表达 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的肿瘤细胞的存在或不存在,其中如果 $\alpha V\beta 6$ 和HER2两者都被过表达,则该患者被诊断为患有对 $\alpha V\beta 6$ 和HER2抑制敏感的乳腺癌。
- [0020] 再一个实施例包括一种用于诊断和治疗患者体内的对 $\alpha V\beta 6$ 抑制敏感的癌症的方法,该方法包括通过测量 $\alpha V\beta 6$ 的水平来分析患者样品中过表达 $\alpha V\beta 6$ 的癌细胞的存在或不存在,其中如果 $\alpha V\beta 6$ 被过表达,则该患者被诊断为患有对 $\alpha V\beta 6$ 抑制敏感的癌症,并且向确诊患者给予治疗有效剂量的:
- [0021] a. $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂,其特异性地结合至 $\alpha V\beta 6$ 并且抑制配体与 $\alpha V\beta 6$ 的结合。
- [0022] 此外,一个实施例包括一种用于诊断和治疗患者体内的对HER2抑制敏感的乳腺癌的方法,该方法包括通过测量 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的水平来分析患者样品中过表达 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的乳腺癌细胞的存在或不存在,其中如果 $\alpha V\beta 6$ 和HER2两者都被过表达,则该患者被诊断为患有对 $\alpha V\beta 6$ 和HER2抑制敏感的乳腺癌,并且向确诊患者给予治疗有效剂量的:
- [0023] a. HER2靶向结合剂,其特异性地结合至HER2并且抑制配体与HER2的结合。
- [0024] 另一个实施例包括一种用于诊断和治疗患者体内的对 $\alpha V\beta 6$ 和HER2抑制敏感的乳腺癌的方法,该方法包括通过测量 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的水平来分析患者样品中过表达 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的乳腺癌细胞的存在或不存在,其中如果 $\alpha V\beta 6$ 和HER2两者都被过表达,则该患者被诊断为患有对 $\alpha V\beta 6$ 和HER2抑制敏感的乳腺癌,并且向确诊患者给予治疗有效剂量的:
- [0025] a. $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂,其特异性地结合至 $\alpha V\beta 6$ 并且抑制配体与 $\alpha V\beta 6$ 的结合;和
- [0026] b. HER2靶向结合剂,其特异性地结合至HER2并且抑制配体与HER2的结合。
- [0027] 再一个方面包括一种用于治疗患者样品中的对 $\alpha V\beta 6$ 抑制敏感的癌症的方法,该方法包括请求测试以确定患者样品是否含有过表达 $\alpha V\beta 6$ 的癌细胞,并且如果该患者样品含有过表达 $\alpha V\beta 6$ 的癌细胞,则给予治疗有效剂量的:
- [0028] a. $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂,其特异性地结合至 $\alpha V\beta 6$ 并且抑制配体与 $\alpha V\beta 6$ 的结合。
- [0029] 又一另外的方面包括一种用于治疗患者样品中的对 $\alpha V\beta 6$ 和HER2抑制敏感的乳腺癌的方法,该方法包括请求测试以确定患者样品是否含有过表达 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的癌细胞,并且如果该患者样品含有过表达 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的癌细胞,则给予治疗有效剂量的:
- [0030] a. $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂,其特异性地结合至 $\alpha V\beta 6$ 并且抑制配体与 $\alpha V\beta 6$ 的结合;和
- [0031] b. HER2靶向结合剂,其特异性地结合至HER2并且抑制配体与HER2的结合。
- [0032] 一个另外的实施例包括一种用于诊断患者体内的对 $\alpha V\beta 6$ 抑制敏感的可以通过抑制 $\alpha V\beta 6$ 治疗的癌症的方法,该方法包括:
- [0033] a. 从该受试者获得生物样品;
- [0034] b. 向该样品中施加特异地结合至 $\alpha V\beta 6$ 的 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂,其中 $\alpha V\beta 6$ 的存在产生 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂- $\alpha V\beta 6$ 复合体;

[0035] c. 在以指示 $\alpha V\beta 6$ 过表达的水平检测到步骤b) 中的复合体的情况下, 诊断乳腺癌的攻击性形式。

[0036] 另一个方面包括一种用于诊断患者体内的对 $\alpha V\beta 6$ 和HER2抑制敏感的可以通过抑制 $\alpha V\beta 6$ 和HER2治疗的乳腺癌的方法, 该方法包括:

[0037] a. 从该受试者获得生物样品;

[0038] b. 向该样品中施加特异性地结合至 $\alpha V\beta 6$ 的 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂, 其中 $\alpha V\beta 6$ 的存在产生 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂- $\alpha V\beta 6$ 复合体;

[0039] c. 任选地向该样品中施加特异性地结合至HER2的HER2靶向结合剂, 其中HER2的存在产生HER2结合剂-HER2复合体; 并且

[0040] d. 在以指示 $\alpha V\beta 6$ 和HER2过表达的水平检测到步骤b) 和c) 中的复合体的情况下, 诊断乳腺癌的攻击性形式。

[0041] 另外的目的与优点将部分地在以下说明书中阐明, 并且部分地从本说明书中显而易见, 或者可以通过实践习得。这些目的与优点将通过在所附权利要求书中具体指出的元素和组合来实现和获得。

[0042] 应理解的是, 前述概述和下列详细描述两者都只是示例性和解释性的并且不限制权利要求书。

[0043] 附图(它们被结合在本说明书中并且构成了本说明书的一部分)展示了一个(若干个)实施例并且与本说明书一起用来解释在此描述的原理。

[0044] 附图简要说明

[0045] 图1A-F的标题为“整合素 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的高共表达预测出乳腺癌患者的存活不佳”。依据整合素 $\alpha V\beta 6$ 表达状态的卡普兰-迈耶(Kaplan-Meier)曲线。打勾标记指示在分析时仍活着的或被检查的患者。所有的P值都指对数秩检验。使用6.2G2抗体(百健艾迪公司(Biogen Idec))针对整合素 $\alpha V\beta 6$ (棕色染色)进行免疫组织化学染色的(A)正常和(B)癌性乳腺癌组织切片。依据整合素 $\alpha V\beta 6$ 状态(高表达为红色, 低表达为黑色)的来自伦敦(C)和诺丁汉(D)的2个乳腺癌患者组群的总体存活率。与肿瘤中的低表达相比, 具有高整合素 $\alpha V\beta 6$ 的患者的P值<0.00001。(E)依据整合素 $\alpha V\beta 6$ 状态的来自合并的伦敦和诺丁汉患者组群的HER2+患者的总体存活率。与低肿瘤相比, 具有高整合素 $\alpha V\beta 6$ 状态的患者的P值<0.001。(F)依据整合素 $\alpha V\beta 6$ 状态的来自METABRIC组群的HER2+患者的总体存活率。与低表达肿瘤相比, 具有高ITGB6表达肿瘤的患者的存活率显著更低(P=0.003)。还请参见图10和图11。

[0046] 图2A-G的标题为“乳腺癌细胞系侵袭是依赖整合素 $\alpha V\beta 6$ 和HER2两者的”。(A)通过流式细胞术评估的整合素 $\alpha V\beta 6$ 和HER2在乳腺癌细胞系组(panel)中的表达。同种型对照以黑色示出, 整合素 $\alpha V\beta 6$ 以蓝色示出并且HER2表达以红色示出(关于分析的完整细胞系组, 参见图12)。(B)表达不同水平的整合素 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的乳腺癌细胞系的Transwell侵袭测定。接种5x 10⁴个细胞/孔并且在72h之后对被侵袭细胞的数目计数。(C) & (D), 乳腺癌细胞系侵袭是依赖整合素 $\alpha V\beta 6$ 的。将细胞用IgG或 $\alpha V\beta 6$ 阻断性抗体($\beta 6Ab$) (101Jg/ml)孵育30min(C)或用对照或J36siRNA(201JM)转染72h(D)并且像之前一样经受Transwell侵袭测定。(E) & (F), 乳腺癌细胞系侵袭是依赖HER2的。将细胞用IgG或曲妥珠单抗(TRA) (101Jg/ml)预处理30min(E)或用对照或HER2siRNA(201JM)转染72h(F)并且经受Transwell侵袭测定。(G)将细胞用IgG、P6Ab、TRA(所有都是101Jg/ml)或阻断性抗体的组合预处理30min&经受Transwell

侵袭测定。一式三份地进行所有实验,示出了代表性实验($n=6 \pm SD$)。 $*P=0.05$, $**P=0.01$, $***P<0.001$ 。还请参见图7。

[0047] 图3A-C的标题为“HER2驱动的侵袭是依赖整合素 $\alpha V\beta 6$ 的。过表达整合素 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的细胞系的Transwell侵袭测定”。将细胞在存在和不存在 $\alpha V\beta 6$ 阻断性抗体(10 $\mu g/ml$)(A)或曲妥珠单抗(TRA)(10 $\mu g/ml$)(B)的情况下用IgG、HRG β (1 μM)预处理30min,并且以5x10⁴个细胞/孔接种到Transwell侵袭测定中。在72h之后对被侵袭细胞的数目计数。一式三份地进行所有实验,示出了代表性实验($n=6 \pm SD$)。 $*P=0.05$, $**P=0.01$, $***P<0.001$ 。(C)MCF10.CA1a(CA1a)细胞系的器官型侵袭。在接种之前,将细胞用IgG、 $\alpha V\beta 6$ 阻断性抗体或TRA(10 $\mu g/ml$)预处理30min或用针对 $\alpha V\beta 6$ 或HER2的siRNA(20 μM)转染72h。将5x10⁴个细胞接种到包含MRC5/hTERT成纤维细胞的胶原:基质胶凝胶之上。孵育5-7天之后,将凝胶在缩甲醛盐水中固定。将凝胶用石蜡包埋,切片并且使切片经受H&E染色。放大倍率条=10 μM 。直方图将进行上述处理的每种细胞的侵袭定量为侵袭指数。一式三份地进行实验($n=2/\text{实验}$),示出了代表性实验。 $*P=0.05$, $**P=0.01$, $***P<0.001$ 。

[0048] 图4A-G的标题为“乳腺癌异种移植物生长是依赖 $\alpha V\beta 6$ 的”。(A)将携带人BT-474肿瘤的小鼠连续两周每周用IgG(黑色)、264RAD(蓝色)、曲妥珠单抗(TRA)(红色)或264RAD+TRA(绿色)(10mg/kg;i.p)处理两次。数据被表示为平均肿瘤体积 $\pm SEM$ ($n \geq 4$ 只小鼠/组)。当肿瘤达到100mm³时开始处理。(B)如在(A)中的来处理携带人HER2-18肿瘤的小鼠。(C)(A)中概述的处理后的代表性BT-474和HER2-18异种移植物的摄影图像。放大倍率条=5mm。(D)BT-474异种移植物蛋白质表达。如在(A)中的来处理异种移植物,收获,提取蛋白质并且进行免疫印迹。针对指定蛋白质对印迹进行探测。(E)通过光密度确定的来自(D)中所示印迹的相对蛋白质表达的直方图($n=3$ 个单独肿瘤 $\pm SEM$)。 $*P=0.05$, $**P=0.01$, $***P<0.001$ 。(F&G)如在(D&E)中概述的HER2-18异种移植物蛋白质表达和定量。

[0049] 图5的标题为“264RAD在SCID小鼠中增强曲妥珠单抗的抗致瘤性并且抑制人异种移植物MCF-7/HER2-18细胞生长,延长存活并且减少 $\alpha V\beta 6$ 、HER2、HER3、Akt2和Smad2”。将携带人MCF-7/HER2-18肿瘤的小鼠连续六周每周用IgG(黑色)、264RAD(蓝色)、曲妥珠单抗(TRA)(红色)或264RAD+TRA(绿色)(10mg/kg;i.p)处理两次。数据被表示为平均肿瘤体积 $\pm SEM$ ($n > 5$ 只小鼠/组)。当肿瘤在任何一个维度上是4mm(A)以及当肿瘤达到200mm³($n > 6$ 只小鼠/组)(B)开始处理。(C)卡普兰-迈耶存活图示出了来自(B)中所示的较大肿瘤的研究的小鼠的存活率。(D)通过针对指定靶标进行免疫印迹来分析来自(A)中的经处理小鼠的肿瘤(消除了组合疗法处理的异种移植物,因此无法用于分析)。肌动蛋白免疫印迹示出了相等的蛋白质输入。(E)定量了来自(D)的蛋白质表达水平变化的直方图(经 β -肌动蛋白校正的)。(F)HER2-18肿瘤异种移植物中的 $\alpha V\beta 6$ 表达的免疫组织化学分析。将异种移植物固定,在如(A)中概述的处理6周或者用264RAD+曲妥珠单抗(264RAD+TRA)处理2周之后切片并且针对P6表达进行染色。放大倍率条=101JM。

[0050] 图6A-D的标题为“整合素 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的高共表达预测出乳腺癌患者的长期存活不佳”。依据整合素 $\alpha V\beta 6$ 表达状态的卡普兰-迈耶曲线。打勾标记指示在分析时仍活着的或被检查的患者。所有的P值都指对数秩检验。依据整合素 $\alpha V\beta 6$ 状态的来自伦敦(A)和诺丁汉(B)组群的乳腺癌患者的15年总体存活率。在肿瘤中具有高整合素 $\alpha V\beta 6$ (红色)与低表达(黑色)的患者的P值分别是P=0.006和P=0.002。(C)依据整合素 $\alpha V\beta 6$ 状态的来自合并的伦敦和诺

丁汉患者组群的HER2阳性患者的15年总体存活率。与低肿瘤相比，具有高整合素 α V β 6状态的患者的P值<0.001。(D) 依据ITGB6基因状态的来自METABRIC组群的HER2阳性患者的15年总体存活率。与低表达肿瘤相比，具有高整合素 α V β 6状态的患者的P值是P=0.048。

[0051] 图7A-C如下。(A) 264RAD在抑制HER2-18和Ca1a细胞的侵袭方面与1005 α V β 6阻断性抗体一样有效。将过表达整合素 α V β 6和HER2的细胞用IgG或 α V β 6阻断性抗体1005或264RAD (10 μ g/ml) 预处理30min并且以5x 10⁴个细胞/孔接种到Transwell侵袭测定中。在72h之后对被侵袭细胞的数目计数。一式三份地进行所有实验,示出了代表性实验(n=6±SD)。*P=0.05,**P=0.01,***P<0.001。(B) 增殖未受经七天的 α V β 6和/或HER2抗体阻断的影响。在于双活性炭处理的FCS培养基中生长48h之前24h接种0.5-2x 10³个细胞/孔。在48h之后,将细胞用IgG、 α V β 6阻断性抗体264RAD、曲妥珠单抗(TRA)(所有都是10 μ g/ml)或阻断性抗体的组合处理7天。7天之后使细胞经受MTS测定并且将‘增殖’(表示线粒体活性)相对于第7天经IgG处理的细胞标绘出。一式三份地进行所有实验,示出了代表性实验(n=6±SD)。(C) α V β 6和HER2共定位在细胞膜中。将MCF-7/HER2-18(HER2-18)和MCF10.CA1a(CA1a)细胞用分别具有Alexa-488和Alexa647的二级缀合物的红色的 α V β 6(1005,密理博公司(Millipore))和绿色的HER2(细胞信号传导技术公司(Cell Signaling Technology))抗体标记。使用DAPI(蓝色)进行核染色。使样品在蔡司(Zeiss) LSM710共聚焦显微镜上成像。放大倍率条=10 μ M。

[0052] 图8的标题为“侵袭不依赖TGF β 并且 α V β 6的阻断在存在和不存在TGF β 配体或TGF β RII的情况下在体外抑制侵袭”。过表达整合素 α V β 6和HER2的细胞系的Transwell基质胶侵袭测定。使细胞经受72h的TGF β RII siRNA处理,之后在存在和不存在TGF β (5ng/ml)的情况下用264RAD(10 μ g/ml)进行处理,并且以5x 10⁴个细胞/孔接种到Transwell侵袭测定中。在72h之后对被侵袭细胞的数目计数。一式三份地进行所有实验,示出了代表性实验(n=6±SD)。*P=0.05,**P=0.01,***P<0.001。

[0053] 图9的标题为“整合素 α V β 6依赖性侵袭是经由Akt2的”。过表达整合素 α V β 6和HER2的细胞系的Transwell侵袭测定。将细胞用对照或者Akt1、Akt2或Akt1+2siRNA(20nM)预处理72h(转染)(A)并且以5x 10⁴个细胞/孔接种到Transwell侵袭测定中。在72h之后对被侵袭细胞的数目计数。一式三份地进行所有实验,示出了代表性实验(n=6±SD)。插图表示siRNA蛋白质敲低的免疫印迹。*P=0.05,**P=0.01。(B) MCF10.CA1a(CA1a)细胞系的器官型侵袭。在接种之前如在(A)中的预处理细胞。将5x 10⁴个细胞接种到包含MRC5/hTERT成纤维细胞的胶原:基质胶凝胶之上。孵育5-7天之后,将凝胶在缩甲醛盐水中固定。将凝胶用石蜡包埋,切片并且使切片经受H&E染色。放大倍率条=10 μ M。直方图将进行上述处理的侵袭定量为侵袭指数。一式三份地进行实验(n=2/实验),示出了代表性实验。*P=0.05,**P=0.01。

[0054] 图10是标题为“伦敦和诺丁汉乳腺癌患者组群的临床病理学特征”的表格。

[0055] 图11是标题为“ α V β 6与乳腺癌中的常规预后指示物的关联”的表格。

[0056] 图12是标题为“一组乳腺癌细胞系中的 α V β 6和HER2表达和受体状态”的表格。分子亚型&受体状态通过尼夫(Neve)等人(2006)&苏比克(Subik)等人(2010)定义。如通过穿过基质胶的侵袭来确定侵袭倾向。通过流式细胞术将表达确定为平均荧光强度(MFI):0-10=-,11-25=+,26-50=++,51-100=+++,>100=++++,ND未确定。

[0057] 图13是在乳腺癌中的 α V β 6和HER2表达研究中所用的抗体列表。

[0058] 图14是线形图,示出了纯化的单克隆抗体结合至 $\alpha V\beta 6$ 并且阻断其与GST-LAP肽结合的能力。

[0059] 图15A和B是线形图,示出了作为分子mAb浓度的函数的平均几何平均荧光(GMF)图,其被用于估计抗体之一对稳定表达人 $\alpha V\beta 6$ 抗原的K562细胞的结合亲和力。图15A中所示的是mAb 188的亲和力数据。图15B示出了mAb 264RAD的亲和力数据。

[0060] 图16A-E是条形图,示出了纯化的单克隆抗体在稳定表达 $\alpha V\beta 6$ 整合素的293细胞中介导补体依赖性细胞毒性的能力。

[0061] 图17是条形图,示出了抗体264RAD、133和188SDM抑制肿瘤生长的能力(使用底特律(Detroit)-562鼻咽细胞系)。

[0062] 图18是柱状图,示出了264RAD与264RAD/ADY的活性比较。

[0063] 序列表

[0064] 实施例包括列于下表1中的特异性抗- $\alpha V\beta 6$ 抗体。该表报告了每种抗- $\alpha V\beta 6$ 抗体的识别号,连同相应的重链和轻链基因的可变域的SEQ ID号。已经给出了每种抗体的识别号,其包括字母“sc”后接数字。

[0065] 表1

mAb ID No.:	序列	SEQ ID NO:
sc 49	编码重链可变区的核苷酸序列	1
	编码重链可变区的氨基酸序列	2
	编码轻链可变区的核苷酸序列	3
	编码轻链可变区的氨基酸序列	4
sc 58	编码重链可变区的核苷酸序列	5
	编码重链可变区的氨基酸序列	6
	编码轻链可变区的核苷酸序列	7
	编码轻链可变区的氨基酸序列	8
[0066] sc 97	编码重链可变区的核苷酸序列	9
	编码重链可变区的氨基酸序列	10
	编码轻链可变区的核苷酸序列	11
	编码轻链可变区的氨基酸序列	12
sc 133	编码重链可变区的核苷酸序列	13
	编码重链可变区的氨基酸序列	14
	编码轻链可变区的核苷酸序列	15
	编码轻链可变区的氨基酸序列	16
sc 161	编码重链可变区的核苷酸序列	17
	编码重链可变区的氨基酸序列	18
	编码轻链可变区的核苷酸序列	19
	编码轻链可变区的氨基酸序列	20
sc 188	编码重链可变区的核苷酸序列	21
	编码重链可变区的氨基酸序列	22

[0067]

mAb ID No.:	序列	SEQ ID NO:
	编码轻链可变区的核苷酸序列	23
	编码轻链可变区的氨基酸序列	24
sc 254	编码重链可变区的核苷酸序列	25
	编码重链可变区的氨基酸序列	26
	编码轻链可变区的核苷酸序列	27
	编码轻链可变区的氨基酸序列	28
sc 264	编码重链可变区的核苷酸序列	29
	编码重链可变区的氨基酸序列	30
	编码轻链可变区的核苷酸序列	31
	编码轻链可变区的氨基酸序列	32
sc 277	编码重链可变区的核苷酸序列	33
	编码重链可变区的氨基酸序列	34
	编码轻链可变区的核苷酸序列	35
	编码轻链可变区的氨基酸序列	36
sc 298	编码重链可变区的核苷酸序列	37
	编码重链可变区的氨基酸序列	38
	编码轻链可变区的核苷酸序列	39
	编码轻链可变区的氨基酸序列	40
sc 320	编码重链可变区的核苷酸序列	41
	编码重链可变区的氨基酸序列	42
	编码轻链可变区的核苷酸序列	43
	编码轻链可变区的氨基酸序列	44
sc 374	编码重链可变区的核苷酸序列	45
	编码重链可变区的氨基酸序列	46
	编码轻链可变区的核苷酸序列	47
	编码轻链可变区的氨基酸序列	48
sc 188 SDM	编码重链可变区的核苷酸序列	70
	编码重链可变区的氨基酸序列	71
	编码轻链可变区的核苷酸序列	72
	编码轻链可变区的氨基酸序列	73
sc 264 RAD	编码重链可变区的核苷酸序列	74
	编码重链可变区的氨基酸序列	75

mAb ID No.:	序列	SEQ ID NO:
	编码轻链可变区的核苷酸序列	76
	编码轻链可变区的氨基酸序列	77
sc 133 TMT	编码重链可变区的核苷酸序列	78
	编码重链可变区的氨基酸序列	79
	编码轻链可变区的核苷酸序列	80
	编码轻链可变区的氨基酸序列	81
sc 133 WDS	编码重链可变区的核苷酸序列	82
	编码重链可变区的氨基酸序列	83
	编码轻链可变区的核苷酸序列	84
	编码轻链可变区的氨基酸序列	85
sc 133 TMT/ WDS	编码重链可变区的核苷酸序列	86
	编码重链可变区的氨基酸序列	87
	编码轻链可变区的核苷酸序列	88
	编码轻链可变区的氨基酸序列	89
sc 264 ADY	编码重链可变区的核苷酸序列	90
	编码重链可变区的氨基酸序列	91
	编码轻链可变区的核苷酸序列	92
	编码轻链可变区的氨基酸序列	93
sc 264 RAD/A DY	编码重链可变区的核苷酸序列	94
	编码重链可变区的氨基酸序列	95
	编码轻链可变区的核苷酸序列	96
	编码轻链可变区的氨基酸序列	97

[0068] [0069] 实施方案的描述

[0070] 现在将详细地参考一个或多个本发明实施例(示例性实施例),其一个或多个实例阐明于附图中。在可能的情况下,将贯穿附图使用相同的参考号来指示相同或相似的部分。

[0071] I. 定义

[0072] 除非另外定义,在此使用的科学术语和技术术语应具有本领域普通技术人员普遍理解的含义。另外,除非上下文另有要求,单数术语应包括复数形式,并且复数术语应包括单数形式。通常,结合在此描述的细胞和组织培养、分子生物学以及蛋白质和寡核苷酸或多核苷酸化学和杂交使用的命名法及其技术是本领域众所周知且通常使用的那些。

[0073] 标准技术用于重组DNA、寡核苷酸合成以及组织培养和转化(例如,电穿孔、脂转染)。酶促反应和纯化技术根据制造商的说明书或如本领域通常实现的或如在此描述的来进行。前述技术和程序通常根据本领域众所周知的常规方法以及如各种一般和更具体的参考文献中所述的来进行,所述参考文献在本说明书自始至终引用和讨论。参见例如,萨姆布鲁克(Sambrook)等人,分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)

(第三版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),冷泉港,纽约(2001)),将其通过引用结合在此。结合在此描述的分析化学、合成有机化学以及医学和药物化学使用的命名法及其实验室程序和技术是本领域众所周知且通常使用的那些。标准技术用于化学合成,化学分析,药物制备,配制和递送以及患者治疗。

[0074] 当根据本披露使用时,除非另有说明,下列术语应当理解为具有下列含义:

[0075] 如在此使用的术语“和/或”应当理解为在有或没有另一者的情况下,两个指定特征或组分中的每一者的特定披露。例如,“A和/或B”被看作是(i) A、(ii) B以及(iii) A和B中的每种的特定披露,就好像在此各自单独陈述一样。

[0076] 拮抗剂可以是多肽、核酸、碳水化合物、脂质、小分子量化合物、寡核苷酸、寡肽、RNA干扰(RNAi)、反义物(antisense)、重组蛋白、抗体或其缀合物或融合蛋白。关于RNAi的综述,参见米亚沃O(Milhavet O)、加里DS(Gary Ds)、马特森MP(Mattson MP)(药理学综述(Pharmacol Rev.)2003年12月;55(4):629-48.综述.)并且关于反义物,参见奥帕林斯卡JB(Opalinska JB)、葛维宝AM(Gewirtz AM)(Sci STKE.2003年10月28日;2003(206):pe47.)。

[0077] “ $\alpha V\beta 6$ ”的疾病相关的异常活化或表达可以是任何异常的、不希望的或病理性的细胞粘附,例如肿瘤相关细胞粘附。细胞粘附相关疾病包括但不限于非实体瘤,如白血病、多发性骨髓瘤或淋巴瘤,并且还有实体瘤,如黑色素瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、神经胶质瘤、肝细胞(肝)癌、成胶质细胞瘤、甲状腺癌、胆管癌、骨癌、胃(gastric)癌、脑/CNS癌、头颈癌、肝脏系统癌、胃(stomach)癌、前列腺癌、乳腺癌、肾(renal)癌、睾丸癌、卵巢癌、皮肤癌、宫颈癌、肺癌、肌肉癌、神经元癌、食管癌、膀胱癌、肺癌、子宫癌、外阴癌、子宫内膜癌、肾(kidney)癌、结直肠癌、胰腺癌、胸膜/腹膜癌、唾液腺癌以及表皮癌。

[0078] 化合物是指分子量小于约2000道尔顿的任何小分子量化合物。

[0079] 术语“ $\alpha V\beta 6$ ”是指由 αV 链和 $\beta 6$ 链组成的异源二聚体整合素分子。

[0080] 当提及靶向结合剂(如抗体)时,术语“中和”涉及所述靶向结合剂消除或显著降低靶抗原的活性的能力。因此,“中和”抗- $\alpha V\beta 6$ 抗体能够消除或显著降低 $\alpha V\beta 6$ 的活性。中和 $\alpha V\beta 6$ 抗体可以例如通过阻断TGFBLAP与整合素 $\alpha V\beta 6$ 的结合来起作用。通过阻断这种结合, $\alpha V\beta 6$ 介导的细胞粘附被显著或完全消除。理想地, $\alpha V\beta 6$ 的中和抗体抑制细胞粘附。

[0081] 如在此使用的术语“分离的多核苷酸”应意指已经从其天然存在的环境中分离出的多核苷酸。此类多核苷酸可以是基因组的、cDNA或合成的。在一些实施例中,分离的多核苷酸不与它们在自然界中相关的所有或一部分多核苷酸相关。分离的多核苷酸可以可操作地连接至在自然界中不与它连接的另一多核苷酸。此外,分离的多核苷酸可以在自然界中不作为更大序列的一部分存在。

[0082] 在此提及的术语“分离的蛋白质”意指已经从其天然存在的环境中分离出的蛋白质。此类蛋白质可以衍生自基因组DNA、cDNA、重组DNA、重组RNA或合成起源或其一些组合,由于其起源或衍生来源的缘故,“分离的蛋白质”(1)不与在自然界中发现的蛋白质相关;(2)不含来自相同来源的其他蛋白质,例如不含鼠类蛋白质;(3)由来自不同物种的细胞进行表达;或(4)不在自然界中存在。

[0083] 在此使用术语“多肽”作为通用术语来指代多肽序列的天然蛋白质、片段或类似物。因此,天然蛋白质、片段和类似物是多肽属(genus)的种(species)。多肽可以包括人重链免疫球蛋白分子和人 κ 轻链免疫球蛋白分子,以及由包含重链免疫球蛋白分子与轻链免

疫球蛋白分子(如κ或λ轻链免疫球蛋白分子)的组合形成的抗体分子,并且反之亦然,及其片段和类似物。多肽还可以仅包括人重链免疫球蛋白分子或其片段。

[0084] 如在此使用的术语“天然存在的”用于客体时是指客体可在自然界中发现的事实。例如,生物体(包括病毒)中存在的可以从自然界中的来源分离的并且没有被实验室人为或以另外的方式刻意修饰过的多肽或多核苷酸序列是天然存在的。

[0085] 如在此使用的术语“可操作地连接”是指如此描述的组分的位置处于允许它们按其预期方式发挥功能的关系。例如,与编码序列“可操作地连接”的控制序列以这样一种方式连接,使得编码序列的表达在与控制序列相容的条件下完成。

[0086] 如在此提及的术语“多核苷酸”意指作为核糖核苷酸或脱氧核苷酸或核苷酸的任一类型的修饰形式或者RNA-DNA杂双链体的长度为至少10个碱基的核苷酸的聚合形式。该术语包括单链和双链形式的DNA。

[0087] 在此提及的术语“寡核苷酸”包括通过天然存在的和非天然存在的键连接在一起的天然存在的和修饰的核苷酸。寡核苷酸是通常包含200个碱基或更少碱基的长度的多核苷酸子集。寡核苷酸的长度可以是10至60个碱基,在其他实施例中,它们的长度可以是12、13、14、15、16、17、18、19或20至40个碱基。寡核苷酸通常是单链的,例如用于探针;但是寡核苷酸也可以是双链的,例如用于在基因突变体的构建中使用。寡核苷酸可以是正义或反义寡核苷酸。

[0088] 在此提及的术语“天然存在的核苷酸”包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。在此提及的术语“修饰的核苷酸”包括具有修饰的或取代的糖基等的核苷酸。在此提及的术语“寡核苷酸键”包括以下寡核苷酸键,如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯(phosphoroselenoate)、二硒代磷酸酯(phosphorodiselenoate)、苯胺硫代磷酸酯(phosphoroanilothioate)、苯胺磷酸酯(phosphoranilate)、氨基磷酸酯等。参见例如,拉普朗什(LaPlanche)等人,核酸研究(Nucl. Acids Res.)14:9081(1986);斯特茨(Stec)等人,美国化学学会杂志(J. Am. Chem. Soc.)106:6077(1984);施泰因(Stein)等人,核酸研究16:3209(1988);索恩(Zon)等人,抗癌药物设计(Anti-Cancer Drug Design)6:539(1991);索恩等人,寡核苷酸及类似物:实用方法(Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach),第87-108页(F. 埃克斯坦(F. Eckstein)编辑,牛津大学出版社,牛津,英格兰(1991));斯特茨等人,美国专利号5,151,510;乌尔曼(Uhlmann)和佩曼(Peyman)化学综述(Chemical Reviews)90:543(1990),将其披露通过引用而特此结合。寡核苷酸可以包括检测用标记,如果需要的话。

[0089] 在此提及的术语“选择性地杂交”意指可检测地且特异性地结合。多核甘酸、寡核甘酸及其片段在如下杂交和洗涤条件下与核酸链选择性地杂交,所述杂交和洗涤条件使与非特异性核酸的可检测结合的可感知量降到最低。高严格条件可以用于达到如本领域已知的且在此讨论的选择性杂交条件。通常,多核苷酸、寡核苷酸或抗体片段与感兴趣的核酸序列之间的核酸序列同源性将至少是80%,并且更典型地,具有至少85%、90%、95%、99%以及100%的增加的同源性。

[0090] 术语“CDR区”或“CDR”旨在指示如由卡巴特(Kabat)等人,1991(卡巴特,E.A.(Kabat,E.A.)等人,(1991)免疫学关注的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第五版,美国健康和人类服务部(US Department of Health

and Human Services),公共服务(Public Service),NIH,华盛顿)以及后期版本定义的免疫球蛋白的重链和轻链的高变区。抗体通常含有3个重链CDR和3个轻链CDR。术语CDR或CDR在此用于根据情况来指示这些区域中的一个或这些区域中的几个或甚至全部,这些区域含有负责通过抗体的亲和力来结合抗原或其所识别的表位的大部分氨基酸残基。

[0091] 在六个短CDR序列之中,重链的第三个CDR(HCDR3)具有较大尺寸变化性(较大变异性基本上归因于产生变异的基因的排列机制)。它可短至2个氨基酸,但是已知的最长尺寸是26。CDR长度还可根据可由特定潜在框架容纳的长度而变化。在功能上,HCDR3在确定抗体的特异性中部分地发挥作用(西格尔(Segal)等人,PNAS,71:4298-4302,1974;艾米特(Amit)等人,科学(Science),233:747-753,1986;乔西亚(Chothia)等人,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.),196:901-917,1987;乔西亚等人,自然(Nature),342:877-883,1989;卡顿(Caton)等人,免疫学杂志(J.Immunol.),144:1965-1968,1990;莎伦(Sharon)等人,PNAS,87:4814-4817,1990;莎伦等人,免疫学杂志,144:4863-4869,1990;卡巴特(Kabat)等人,免疫学杂志,147:1709-1719,1991)。

[0092] 在此提及的术语一“套CDR”包括CDR1、CDR2和CDR3。因此,一套HCDR是指HCDR1、HCDR2和HCDR3(HCDR是指可变重链CDR),并且一套LCDR是指LCDR1、LCDR2和LCDR3(LCDR是指可变轻链CDR)。除非另行说明,一“套CDR”包括HCDR和LCDR。

[0093] 如果在其序列之间存在部分或完全一致性,则两个氨基酸序列是“同源的”。例如,85%同源性意指当针对最大匹配对两个序列进行比对时,85%的氨基酸是相同的。空位(在进行匹配的两个序列的任一者中)在最大化匹配中是允许的;在一些实施例中使用5或更小的空位长度,并且在其他实施例中使用2或更小的空位长度。可替代地,用突变数据矩阵和6或更大的空位罚分,使用程序ALIGN,如果两个蛋白质序列(或从它们衍生的长度为至少约30个氨基酸的多肽序列)具有超过5的比对分数(以标准差单位计),则它们是同源的,如该术语在此使用的。参见达伊霍夫,M.O.(Dayhoff,M.O.),在蛋白质序列和结构图集(Atlas of Protein Sequence and Structure),第101-110页(第5卷,国家生物医学研究基金会(1972))和此卷的增刊2,第1-10页。当使用ALIGN程序进行最佳比对时,如果其氨基酸大于或等于50%相同,则两个序列或其部分是同源的。应当理解的是,在两个直系同源序列内可以存在不同同源性区域。例如,小鼠和人直系同源物的功能性位点可以具有比非功能性区域更高的同源性水平。

[0094] 在此使用术语“对应于”意指多核苷酸序列与参考多核苷酸序列的全部或一部分同源(即,相同,而不严格地进化相关),或多核苷酸序列与参考多核苷酸序列相同。

[0095] 截然不同的是,在此使用术语“互补于”意指互补序列与参考多核苷酸序列的全部或一部分同源。为了说明,核苷酸序列“TATAC”对应于参考序列“TATAC”并且与参考序列“GTATA”互补。

[0096] 术语“序列一致性”意指在比较窗上,两个多核苷酸或氨基酸序列是相同的(即,在核苷酸-核苷酸或残基-残基基础上)。术语“序列一致性百分比”是通过如下方法计算的:在比较窗上比较两个最佳比对序列,确定在两个序列中出现相同核酸碱基(例如,A、T、C、G、U或I)或氨基酸残基的位置的数目从而得到匹配位置的数目,用匹配位置的数目除以在比较窗(即,窗口尺寸)中的总位置数目,并且将结果乘以100从而得到序列一致性百分比。如在此使用的术语“基本一致性”表示多核苷酸或氨基酸序列的特征,其中多核苷酸或氨基酸包

括在至少18个核苷酸(6个氨基酸)位置的比较窗上,时常在至少24-48个核苷酸(8-16个氨基酸)位置的比较窗上与参考序列相比具有至少85%序列一致性、至少90%至95%序列一致性或至少99%序列一致性的序列,其中序列一致性百分比是通过在比较窗上比较参考序列与可以包括总计20%或更少的参考序列的缺失或添加的序列来计算的。参考序列可以是更大序列的子集。

[0097] 如在此使用的,二十个常规氨基酸及其缩写遵循常规用法。参见免疫学-合成期刊(Immunology-A Synthesis)(第二版,E.S.戈卢布(E.S.Golub)和D.R.格伦(D.R.Gren)编辑,Sinauer Associates出版社,桑德兰(Sunderland),马萨诸塞州(Mass.)(1991)),将其通过引用结合在此。二十种常规氨基酸、非天然氨基酸(如 α -, α -二取代的氨基酸、N-烷基氨基酸)、乳酸以及其他非常规氨基酸的立体异构体(例如,D-氨基酸)也可以是在此的多肽的适合组分。非常规氨基酸的实例包括:4-羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、 ϵ -N,N,N-三甲基赖氨酸、 ϵ -N-乙酰基赖氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰基丝氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、 σ -N-甲基精氨酸以及其他类似的氨基酸和亚氨基酸(例如,4-羟基脯氨酸)。在于此使用的多肽符号中,根据标准用法和约定,左手方向是氨基末端方向并且右手方向是羧基末端方向。

[0098] 类似地,除非另外说明,单链多核苷酸序列的左手端是5' 端;双链多核苷酸序列的左手方向被称为5' 方向。新生RNA转录物的5' 至3' 加成方向被称为转录方向;在具有与RNA相同序列的DNA链上的并且是RNA转录物的5' 端的5' 的序列区域被称为“上游序列”;在具有与RNA相同序列的DNA链上的并且是RNA转录物的3' 端的3' 的序列区域被称为“下游序列”。

[0099] 当应用于多肽时,术语“基本一致性”意指当使用默认空位权重如通过程序GAP或BESTFIT进行最佳比对时,两个肽序列享有至少80%序列一致性、至少90%序列一致性、至少95%序列一致性或至少99%序列一致性。不相同的残基位置因保守氨基酸取代而不同。保守氨基酸取代是指具有相似侧链的残基的可互换性。例如,具有脂肪族侧链的一组氨基酸是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸以及异亮氨酸;具有脂肪族-羟基侧链的一组氨基酸是丝氨酸和苏氨酸;具有含酰胺侧链的一组氨基酸是天冬酰胺和谷氨酰胺;具有芳香族侧链的一组氨基酸是苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;具有碱性侧链的一组氨基酸是赖氨酸、精氨酸和组氨酸;并且具有含硫侧链的一组氨基酸是半胱氨酸和甲硫氨酸。保守氨基酸取代组是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸以及天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0100] 如在此讨论的,考虑了抗体或免疫球蛋白分子的次要氨基酸序列变化,其条件是氨基酸序列变化保持与在此描述的抗体或免疫球蛋白分子至少约75%、至少80%、90%、95%或约99%的序列一致性。具体而言,考虑了保守氨基酸置换。保守置换是发生在具有相关侧链的氨基酸家族内的那些。遗传编码的氨基酸通常被分为以下家族:(1)酸性的=天冬氨酸、谷氨酸;(2)碱性的=赖氨酸、精氨酸、组氨酸;(3)非极性的=丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸;以及(4)极性不带电的=甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。在一个实施例中,家族是:丝氨酸和苏氨酸是脂肪族-羟基家族;天冬酰胺和谷氨酰胺是含酰胺家族;丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸是脂肪族家族;并且苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸是芳香族家族。例如,可以合理预期的是,用异亮氨酸或缬氨酸单独置换亮氨酸、用谷氨酸单独置换天冬氨酸、用丝氨酸单独置

换苏氨酸或用结构相关氨基酸类似地置换氨基酸对所得分子的结合功能或特性将不会具有重大影响,尤其是如果置换不涉及框架位点内的氨基酸的话。

[0101] 可以通过测定多肽衍生物的比活性来容易地确定氨基酸改变是否产生功能肽。在此详细描述了测定。本领域的普通技术人员可以容易地制备抗体或免疫球蛋白分子的片段或类似物。在一个实施例中,片段或类似物的氨基末端和羧基末端出现在功能域的边界附近。可以通过将核苷酸和/或氨基酸序列数据与公共或专用序列数据库进行比较来鉴定结构域和功能域。计算机化比较方法被用来鉴定出现在具有已知结构和/或功能的其他蛋白质中的序列基序或预测的蛋白质构象域。鉴定折叠成已知三维结构的蛋白质序列的方法是已知的。博维(Bowie)等人,(1991)科学(Science)253:164。因此,前述实例证明,本领域的普通技术人员可以根据在此描述的抗体识别可用于定义结构域和功能域的序列基序和结构构象。

[0102] 再一个方面是包含如下VH域的靶向结合剂或抗体分子,该VH域与示于表1、所附序列表中的任何抗体、在此描述的抗体的VH域或与示于表8或表29中的HCDR(例如,HCDR1、HCDR2或HCDR3)具有至少约60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%或约99%氨基酸序列一致性。该靶向结合剂或抗体分子还可以任选地包括如下VL域,该VL域与示于表1、所附序列表中的任何抗体、在此描述的抗体的VL域或与示于表9或表30中的LCDR(例如,LCDR1、LCDR2或LCDR3)具有至少约60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%或约99%氨基酸序列一致性。可用于计算两个氨基酸序列的%一致性的算法包括例如BLAST(阿特休尔(Altschul)等人,(1990)分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)215:405-410)、FASTA(皮尔森(Pearson)和李普曼(Lipman)(1988)PNAS USA 85:2444-2448)或史密斯-沃特曼(Smith-Waterman)算法(史密斯(Smith)和沃特曼(Waterman)(1981)分子生物学杂志147:195-197),例如使用默认参数。在一些实施例中,享有如以上所述的氨基酸序列一致性的靶向结合剂或抗体展示出与所参考的抗体基本上相同的活性。例如,基本上相同的活性包括与参考抗体的活性相差不超过约50%、40%、30%、20%、10%、5%、2%、1%或更少的至少一种活性。

[0103] 抗原结合位点通常由可变重链(VH)和可变轻链(VL)免疫球蛋白域形成,并且抗原结合界面由六个称作互补决定区(CDR)的表面多肽环形成。在每个VH中存在三个CDR(HCDR1、HCDR2、HCDR3),并且在每个VL中存在三个CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3),连同框架区(FR)。

[0104] 典型地,VH域与VL域配对以便提供抗体抗原结合位点,但是VH或VL域可单独用于结合抗原。VH域(例如来自表1)可以与VL域(例如来自表1)配对,这样使得形成包含VH和VL域两者的抗体抗原结合位点。针对在此披露的其他VH和VL域提供了类似实施例。在其他实施例中,表8或表29中的VH链与异源VL域配对。轻链混杂在本领域中为沿用已久的。另外,针对在此披露的其他VH和VL域提供了类似实施例。因此,亲本或表9或表30中的任何抗体链的VH可以与亲本或表1中的任何抗体或其他抗体的VL配对。

[0105] 抗原结合位点可以包括亲本抗体或表1中的任何抗体的一套H和/L CDR,并且在所披露的该套H和/L CDR内具有多达二十个、十六个、十个、九个或更少(例如一个、两个、三个、四个或五个)氨基酸添加、取代、缺失和/或插入。可替代地,抗原结合位点可以包括亲本抗体或表1中的任何抗体的一套H和/L CDR,并且在所披露的该套H和/L CDR内具有多达二十个、十六个、十个、九个或更少(例如一个、两个、三个、四个或五个)氨基酸取代。此

类修饰可以潜在地在该套CDR内的任何残基处进行。

[0106] 在一个实施例中,氨基酸取代是以下那些,其:(1)降低对蛋白水解的敏感性,(2)降低对氧化的敏感性,(3)改变对形成蛋白质复合体的结合亲和力,(4)改变结合亲和力,以及(5)赋予或改变此类类似物的其他理化或功能特性。除了天然存在的肽序列之外,类似物可以包括序列的各种突变蛋白。例如,单个或多个氨基酸取代(在一个实施例中,保守氨基酸取代)可以在天然存在的序列中(在一个实施例中,在多肽的形成分子间接触的一个或多个域外的部分中)进行。保守氨基酸取代基本上不应改变亲本序列的结构特征(例如,置换氨基酸不应倾向于使出现在亲本序列中的螺旋断裂,或破坏表征亲本序列的其他类型的二级结构)。本领域公认的多肽二级和三级结构的实例描述于蛋白质,结构与分子原则(*Proteins, Structures and Molecular Principles*) (克赖顿(Creighton)编辑,W.H.弗里曼公司(W.H.Freeman and Company),纽约(1984));蛋白质结构简介(*Introduction to Protein Structure*) (C.布兰登(C.Branden)和J.图兹(J.Tooze)编辑,加兰出版社(Garland Publishing),纽约,纽约州(1991));以及桑顿(Thornton)等人自然(Nature)354:105(1991)中,将其各自通过引用结合在此。

[0107] 再一个方面是包含如下VH域的抗体分子,该VH域与列于表1、所附序列表中的或在此描述的任何抗体的VH域或与示于表8或表29中的HCDR(例如,HCDR1、HCDR2或HCDR3)具有至少约60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%或约99%氨基酸序列一致性。该抗体分子还可以任选地包括如下VL域,该VL域与示于表1、所附序列表中的或在此描述的任何抗体的VL域或与示于表9或表30中的LCDR(例如,LCDR1、LCDR2或LCDR3)具有至少60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%或99%氨基酸序列一致性。可用于计算两个氨基酸序列的%一致性的算法包括例如BLAST(阿特休尔(Altschul)等人,(1990)分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)215:405-410)、FASTA(皮尔森(Pearson)和李普曼(Lipman)(1988)PNAS USA 85:2444-2448)或史密斯-沃特曼(Smith-Waterman)算法(史密斯(Smith)和沃特曼(Waterman)(1981)分子生物学杂志147:195-197),例如使用默认参数。

[0108] VH和VL域以及CDR的变体(包括在此陈述其氨基酸序列,并且可用于 α V β 6的靶向剂和抗体的那些)可以通过序列改变或突变并且针对希望的特征筛选抗原的方法来获得。希望的特征的实例包括但不限于:相对于对抗原具有特异性的已知抗体,对该抗原的结合亲和力增加;相对于对抗原具有特异性的已知抗体,抗原活性的中和增加,如果活性已知的话;在具体摩尔比下,与已知抗体或配体针对抗原的指定竞争能力;使复合体免疫沉淀的能力;结合至指定表位的能力;线性表位,例如使用如在此描述的肽结合扫描鉴定的肽序列,例如使用在线性和/或受限构象中筛选的肽;由不连续的残基形成的构象表位;调节 α V β 6或下游分子的新生物活性的能力。这些方法也在此提供。

[0109] 可以在此产生和使用在此披露的抗体分子的变体。在将多变量数据分析技术应用于结构/特性-活性关系的计算化学的指引下(沃尔德(Wold)等人,化学多变量数据分析:化学计量学数学与化学统计学(Multivariate data analysis in chemistry.Chemometrics-Mathematics and Statistics in Chemistry)(编辑:B.科瓦尔斯基(B.Kowalski)),D.赖德尔出版公司(D.Reidel Publishing Company),多德雷赫特,荷兰,1984),可以使用众所周知的数学技术导出抗体的定量活性-特性关系,如统计回归、模式识别与分类(诺曼(Norman)等人,应用回归分析(Applied Regression Analysis).威利

国际科学公司(Wiley-Interscience) ;第三版(1998年4月) ;坎德尔,亚伯拉罕(Kandel, Abraham) &贝克,埃里克(Backer, Eric) .聚类分析中的计算机辅助推理(Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis) .普伦蒂斯霍尔出版社(Prentice Hall PTR), (1995年5月11日) ;库拉托夫斯基,佛伊泰克(Krzanowski, Wojtek) .多变量分析原理:从用户的角度来看(Principles of Multivariate Analysis:A User's Perspective) (牛津大学统计科学系列,第22期(论文)) .牛津大学出版社; (2000年12月) ;威滕,伊恩·H.(Witten, Ian H.) &弗兰克,艾贝(Frank, Eibe) .数据挖掘:通过Java实现的实用机器学习工具与技术(Data Mining:Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations) .摩根考夫曼(Morgan Kaufmann); (1999年10月11日) ;大卫丹尼森G.T.(Denison David G.T.) (编辑),克里斯托弗C.霍姆斯(Christopher C. Holmes)、巴尼K.马利克(Bani K. Mallick)、艾德里F.M.史密斯(Adrian F.M. Smith) .非线性分类和回归的贝叶斯方法(Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression) (威利系列概率统计(Wiley Series in Probability and Statistics)) .约翰威利父子公司(John Wiley&Sons); (2002年7月) ;戈塞,奥雅纳K.(Ghose, Arup K.) &维斯瓦南汉,维拉卡尔德N.(Viswanadhan, Vellarkad N.) 组合文库设计和评估原则:药物研发中的软件,工具和应用程序(Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery))。抗体的特性可从抗体序列、功能和三维结构的经验和理论模型(例如,分析可能的接触残基或计算物理化学特性)来得到并且这些特性可逐一地和组合地考虑。

[0110] 主要由VH域和VL域组成的抗体抗原结合位点通常由六个多肽环形成:三个来自轻链可变域(VL) 并且三个来自重链可变域(VH) 。已知原子结构的抗体的分析已经阐明抗体组合位点的序列与三维结构之间的关系。这些关系暗示,除了VH域中的第三区域(环),结合位点环具有少量主链构象之一:典型结构。在特定环中形成的典型结构已被证明由其尺寸和在环和框架区中的关键位点存在某些残基来确定。

[0111] 序列-结构关系的此研究可用于预测具有已知序列,但是具有未知三维结构的抗体中的那些残基,这对于维持其CDR环的三维结构并且由此保持结合特异性为至关重要的。这些预测可通过将预测与来自前导优化实验的输出进行比较来获得支持。在结构方法中,可使用任何可免费获得的或商业的程序包(如WAM) 来建立抗体分子的模型。然后,蛋白质可视化和分析软体包(如Insight II(埃塞来瑞斯公司(Accelrys, Inc.)) 或Deep View) 可用于评估CDR中的每个位置处的可能取代。然后,此信息可用于产生可能的取代从而对活性具有最小或有利影响。

[0112] 产生在CDR、抗体VH或VL域和/或结合剂的氨基酸序列之内的取代所需的技术通常在本领域是可获得的。可产生具有取代的变体序列,可预测或不可预测这些取代对活性具有最小或有利影响,并且针对结合和/或中和能力和/或任何其他希望的特性来测试。

[0113] 可以使用其序列确切地披露在此的任何VH和VL域的可变域氨基酸序列变体,如所讨论的。

[0114] 如在此使用的术语“多肽片段”是指具有氨基末端和/或羧基末端缺失,但是其中剩余的氨基酸序列与例如从全长cDNA序列推导的天然存在的序列中的对应位置相同的多肽。片段典型地是至少约5、6、8或10个氨基酸长,在一个实施例中,至少约14个氨基酸长、至

少约20个氨基酸长、至少约50个氨基酸长或至少约70个氨基酸长。如在此使用的术语“类似物”是指由至少约25个氨基酸的区段构成的多肽，该区段与推导的氨基酸序列的一部分具有基本一致性并且具有至少一种以下特性：(1)在适合的结合条件下特异性地结合至 $\alpha V\beta 6$ ，(2)阻断适当的配体/ $\alpha V\beta 6$ 结合的能力，或(3)抑制 $\alpha V\beta 6$ 活性的能力。典型地，多肽类似物相对于天然存在的序列包括保守氨基酸取代(或添加或缺失)。类似物典型地是至少20个氨基酸长、至少50个氨基酸长或更长，并且通常可以与天然存在的全长多肽一样长。

[0115] 肽类似物通常在制药工业中被用作具有类似于模板肽的那些的特性的非肽药物。这些类型的非肽化合物被称为“肽模拟物(peptide mimetic)”或“模拟肽(peptidomimetic)”。福克尔(Fauchere)，药物研究进展杂志(J. Adv. Drug Res.) 15:29 (1986)；韦伯(Veber)和弗赖丁格(Freidinger)TINS第392页(1985)；以及埃文斯(Evans)等人，药物化学杂志(J. Med. Chem.) 30:1229 (1987)，将其通过引用结合在此。通常借助于计算机化分子建模来开发此类化合物。在结构上类似于治疗上有用的肽的肽模拟物可以用于产生等效治疗或预防效果。通常，模拟肽在结构上类似于范例多肽(即，具有生化特性或药理活性的多肽)，如人抗体，但是具有一个或多个通过本领域众所周知的方法任选地被选自以下各项的键替换的肽键：--CH₂NH--、--CH₂S--、--CH₂-CH₂--、--CH=CH--(顺式和反式)、--COCH₂--、--CH(OH)CH₂--以及-CH₂SO--。用相同类型的D-氨基酸系统性取代共有序列的一个或多个氨基酸(例如，用D-赖氨酸代替L-赖氨酸)可以用于产生稳定的肽。此外，可以通过本领域已知的方法(里梭(Rizo)和吉尔施(Gierasch)生物化学年鉴(Ann. Rev. Biochem.) 61:387 (1992)，通过引用结合在此)，例如通过添加能够形成使肽环化的分子内二硫桥的内部半胱氨酸残基来产生包含共有序列或基本上相同的共有序列变异的受限肽。

[0116] 如在此使用的，术语“抗体”指代由通过多肽链的折叠形成的至少一个结合域构成的多肽或多肽组，这些多肽链具有三维结合空间，其中内表面形状和电荷分布与抗原的抗原决定簇的特征互补。抗体典型地具有四聚体形式，包括两对相同的多肽链，每对具有一个“轻链”和一个“重链”。每个轻/重链对的可变区形成抗体结合位点。

[0117] 如在此使用的，“靶向结合剂”是可以结合至靶位点的试剂(例如抗体)或其结合片段。在一个实施例中，靶向结合剂仅对一个靶位点具有特异性。在其他实施例中，靶向结合剂对多于一个靶位点具有特异性。在一个实施例中，靶向结合剂可以是单克隆抗体并且靶位点可以是表位。如下文所述的，靶向结合剂可以包括抗体的至少一个抗原结合域，其中所述域被融合或被包含在异源蛋白质内。

[0118] 通过重组DNA技术，或通过酶促或化学裂解完整抗体而产生抗体的“结合片段”。结合片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv以及单链抗体。除了“双特异性”或“双功能性”抗体之外，抗体被理解为其每个结合位点都是相同的。当过量的抗体将结合至受体的受体的量减少至少约20%、40%、60%或80%，并且更通常大于约85%(如在体外竞争性结合测定中所测量的)时，抗体实质上抑制受体粘附至受体。

[0119] 抗体可以是寡克隆的、多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、CDR嫁接抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、催化抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体、抗独特型抗体以及可以被标记为可溶性或结合形式的抗体及其片段、变体或衍生物，单独的或与通过已知技术提供的其他氨基酸序列结合。抗体可以来自任何物种。术语抗体还包括在此的抗体的结合片段；示例性片段包括Fv、Fab、Fab'、单链抗体(svFC)、二聚可变区(双抗体)以及二硫化物

稳定的可变区 (dsFv)。

[0120] 已经显示完整抗体的片段可以执行结合抗原的功能。结合片段的实例是 (沃德, E.S. (Ward, E.S.) 等人, (1989) 自然 (Nature) 341, 544–546) 由 VL、VH、CL 和 CH1 域组成的 Fab 片段; (麦卡弗蒂 (McCafferty) 等人, (1990) 自然, 348, 552–554) 由 VH 和 CH1 域组成的 Fd 片段; (霍尔特 (Holt) 等人, (2003) 生物技术趋势 (Trends in Biotechnology) 21, 484–490) 由单一抗体的 VL 和 VH 域组成的 Fv 片段; (iv) dAb 片段 (沃德, E.S. 等人, 自然 341, 544–546 (1989); 麦卡弗蒂等人, (1990) 自然, 348, 552–554, 霍尔特等人, (2003) 生物技术趋势 21, 484–490], 其由 VH 或 VL 域组成; (v) 分离的 CDR 区; (vi) F(ab')₂ 片段, 包含两个连接的 Fab 片段的二价片段; (vii) 单链 Fv 分子 (scFv), 其中 VH 域和 VL 域通过肽接头连接, 这允许两个域缔合以形成抗原结合位点 (伯德 (Bird) 等人, (1988) 科学 (Science), 242, 423–426; 休斯顿 (Huston) 等人, (1988) PNAS USA, 85, 5879–5883); (viii) 双特异性单链 Fv 二聚体 (PCT/US 92/09965) 以及 (ix) “双抗体”, 通过基因融合构建的多价或多特异性片段 (WO 94/13804; 霍林格 P. (Holliger, P.) 等人 (1993), 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 90 6444–6448)。Fv、scFv 或 双抗体分子可以通过掺入连接 VH 和 VL 域的二硫桥来稳定 (赖特尔, Y. (Reiter, Y.), 自然生物技术 (Nature Biotech), 14, 1239–1245, 1996)。还可产生包含连接至 CH3 域的 scFv 的迷你抗体 (胡, S. (Hu, S.) 等人, (1996) 癌症研究 (Cancer Res.), 56, 3055–3061)。结合片段的其他实例是 Fab', 它与 Fab 片段的不同之处在于重链 CH1 域的羧基末端添加少许残基, 包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸, 以及 Fab' -SH, 它为恒定域的半胱氨酸残基带有游离巯基的 Fab' 片段。

[0121] 术语“表位”包括能够特异性地结合至免疫球蛋白或 T 细胞受体的任何蛋白决定簇。表位决定簇通常由分子 (如氨基酸或糖侧链) 的化学活性表面基团组成, 并且可以 (但并不总是) 具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。当解离常数是 ≤1 μM、≤100 nM 或 ≤10 nM 时, 将抗体说成特异性地结合抗原。

[0122] 在此使用术语“试剂”来表示化合物、化合物混合物、生物大分子或由生物学材料制备的提取物。

[0123] 就 αVβ6 异源二聚体多肽而言的“有活性”或“活性”是指 αVβ6 异源二聚体多肽的一部分具有天然 αVβ6 多肽的生物活性或免疫活性。当在此使用时, “生物的”是指由天然 αVβ6 多肽的活性导致的生物学功能。αVβ6 生物活性包括例如 αVβ6 诱导的细胞粘附。

[0124] 当在此使用时, “哺乳动物”是指被认为是哺乳动物的任何动物。在一个实施例中, 哺乳动物是人。

[0125] 用酶木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段 (也称作“Fab”片段) 以及没有抗原结合活性但是具有结晶能力的“Fc”片段。用酶胃蛋白酶消化抗体产生 F(ab')₂ 片段, 其中抗体分子的两臂仍是连接的并且包括两个抗原结合位点。F(ab')₂ 片段具有交联抗原的能力。

[0126] 当在此使用时, “Fv”是指抗体的保留抗原识别和抗原结合位点两者的最小片段。

[0127] 当在此使用时, “Fab”是指抗体的包含轻链的恒定域和重链的 CH1 域的片段。

[0128] 术语“mAb”是指单克隆抗体。

[0129] 当在此使用时, “脂质体”是指可以有用于将可包括 αVβ6 多肽或这样一种 αVβ6 多肽的抗体的药物递送到哺乳动物的小囊泡。

[0130] “标记(label)”或“标记的(labeled)”是指向多肽添加可检测部分,例如,放射性标记、荧光标记、酶标记、化学发光标记或生物素基基团。放射性同位素或放射性核素可以包括³H、¹⁴C、¹⁵N、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I,荧光标记可以包括罗丹明、镧系荧光粉或FITC并且酶标记可以包括辣根过氧化物酶、β-半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶。

[0131] 另外的标记包括(通过说明而非限制的方式):酶,如葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(“G6PDH”)、α-D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖淀粉酶、碳酸酐酶、乙酰胆碱酯酶、溶菌酶、苹果酸脱氢酶以及过氧化物酶;染料;另外的荧光标记或荧光剂包括如荧光素及其衍生物、荧光染料、GFP(GFP是“绿色荧光蛋白”的缩写)、丹酰、伞形酮、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二甲醛以及荧光胺;荧光团如镧系穴合物和螯合物,例如铕等(珀金埃尔默(Perkin Elmer)和顺生物国际(Cis Biointernational));化学发光标记或化学发光剂,如异鲁米诺、鲁米诺和二氧化杂环丁烷;敏化剂;辅酶;酶底物;颗粒,如乳胶或碳颗粒;金属溶胶;微晶;脂质体;细胞等,其可以用染料、催化剂或其他可检测基团进一步标记;分子,例如生物素、地高辛或5-溴脱氧尿苷;毒素部分,例如像选自下组的毒素部分:假单胞菌外毒素(PE或其细胞毒性片段或突变体),白喉毒素或其细胞毒性片段或突变体,肉毒杆菌毒素A、B、C、D、E或F,蓖麻毒素或其细胞毒性片段例如蓖麻毒素A,相思豆毒素或其细胞毒性片段,皂素或其细胞毒性片段,美洲商陆抗病毒毒素或其细胞毒性片段以及异株腹泻蛋白1或其细胞毒性片段。

[0132] 如在此使用的术语“药剂”是指当恰当地给予患者时能够诱导所希望的治疗效果的化合物或组合物。根据本领域的常规用法使用在此的其他化学术语,如通过麦格劳-希尔化学名词词典(The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms)(帕克,S.(Parker,S.)编辑,麦格劳-希尔公司(McGraw-Hill),旧金山(1985))(通过引用结合在此)示例的。

[0133] 如在此使用的,“基本上纯的”意指目标种类是存在的优势种类(即,在摩尔基础上,它与组合物中的任何其他个别种类相比是更丰富的),并且被基本上纯化的级分可以是这样一种组合物,其中目标种类包括至少约50%的存在的所有大分子种类(在摩尔基础上)。通常,基本上纯的组合物将包括超过约80%的该组合物中存在的所有大分子种类,或者可以包括至少约85%、90%、95%以及99%。在一个方面中,目标种类被纯化至基本同质(通过常规检测方法无法在组合物中检测到污染物种类),其中该组合物基本上由单一分子种类组成。

[0134] 术语“患者”包括人类和兽医学受试者。

[0135] II.治疗方法

[0136] A.过表达αVβ6的癌细胞的治疗方法概述

[0137] 了解αVβ6在某些癌症中的作用,可以通过向患者或向癌细胞给予αVβ6靶向结合剂来抑制αVβ6,可以用来治疗癌症或抑制肿瘤细胞(包括但不限于过表达αVβ6的癌细胞)的生长。

[0138] 特异性地结合至αVβ6并且抑制配体与αVβ6的结合的αVβ6靶向结合剂可以用于治疗动物体内的恶性肿瘤(包括但不限于乳腺癌)的方法中。可替代地,恶性肿瘤可以是卵巢癌、胰腺癌、肺癌、结直肠癌、头颈癌、食管癌、胃癌以及肝细胞癌。在另一个实施例中,αVβ6靶向结合剂可以用来抑制肿瘤细胞(包括但不限于来自在本段中列举的癌症类型的肿瘤细胞)的生长。

[0139] 在一个实施例中,动物是哺乳动物。在另一个实施例中,动物可以是人。

[0140] 在这样一种治疗中,可以使用一种或多种 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂。因此,单数“一个/种”的使用包括复数。

[0141] 此类方法可以与过表达 $\alpha V\beta 6$ 的恶性肿瘤或肿瘤细胞的诊断分开使用或者此类方法可以与其组合使用。

[0142] 在一个实施例中,此类方法在描述的剂量范围内使用在第IV节中描述的 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂。在一个实施例中, $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂是单克隆抗体。在另一个实施例中,它是全人单克隆实施例。在又另一个实施例中,它是sc 264RAD。

[0143] 在一个实施例中, $\alpha V\beta 6$ 的至少一种下游靶标的水平被下调。在一个实施例中,Akt2和Smad2中至少一者的水平被下调。在一个实施例中,靶标的总水平被下调。在另一个实施例中,靶标的磷酸化水平被下调。可以通过确定蛋白质水平来测量下调或者可以通过确定mRNA水平来测量下调。下调和/或抑制包括与治疗前相比,至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%的减少。

[0144] 在一个实施例中,乳腺癌细胞对曲妥珠单抗有抗性。因此,一个实施例包括一种抑制抗曲妥珠单抗的肿瘤细胞的生长的方法,该方法包括向所述细胞给予治疗有效剂量的 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂,该 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂特异性地结合至 $\alpha V\beta 6$ 并且抑制配体与 $\alpha V\beta 6$ 的结合。

[0145] B. 组合疗法

[0146] 当 $\alpha V\beta 6$ 抑制剂被用于治疗恶性肿瘤或抑制肿瘤细胞生长时, $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂可以作为唯一疗法给予或者它可以在组合疗法方案中与常规手术或放疗或化疗一起给予。这样的联合治疗可以通过同时地、顺序地或分开地给予治疗的单独组分的方式来实现。在给药是顺序的或分开的情况下,给予第二组分的延迟不应达到失去组合的有益效果的程度。

[0147] 除 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂之外,还可以使用一种或多种组合治疗剂;同样地,可以使用一种或多种 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂。因此,单数“一个/种”的使用包括复数。此类组合产品在描述的剂量范围内使用在此描述的 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂并且在其批准的剂量范围内使用组合治疗剂。

[0148] 1. 针对乳腺癌的组合疗法

[0149] 组合疗法可以用于乳腺癌肿瘤的治疗中或用于抑制乳腺癌肿瘤细胞的生长。

[0150] 此类方法可以与过表达 $\alpha V\beta 6$ 、过表达HER2或过表达 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的恶性肿瘤或肿瘤细胞的诊断分开使用或者此类方法可以与其组合使用。

[0151] 此类方法可以与过表达 $\alpha V\beta 6$ 的恶性肿瘤或肿瘤细胞的诊断分开使用或者此类方法可以与其组合使用。

[0152] 在一个实施例中,乳腺癌细胞对曲妥珠单抗有抗性。因此,一个实施例包括一种抑制抗曲妥珠单抗的肿瘤细胞的生长的方法,该方法包括向所述细胞给予治疗有效剂量的 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂和HER2靶向结合剂,该 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂特异性地结合至 $\alpha V\beta 6$ 并且抑制配体与 $\alpha V\beta 6$ 的结合,该HER2靶向结合剂特异性地结合至HER2并且抑制配体与HER2的结合。

[0153] 在一个实施例中,组合治疗剂可以是曲妥珠单抗。在另一个实施例中,组合治疗剂是HER2靶向结合剂,该HER2靶向结合剂特异性地结合至HER2并且抑制配体与HER2的结合。

[0154] 在另一个实施例中,组合治疗剂可以是吉西他滨、多西他赛、EGFR抑制剂、HER-2抑制剂(包括但不限于曲妥珠单抗或赫塞汀®)、PI3K抑制剂(ATK抑制剂(如AZD5363、MK2206)、雷帕霉素类似物(rapalogue)(如依维莫司)、AZD2014、PI3K α 抑制剂、PI3K β 抑制剂

(AZD8186、GSK2636771、SAR 260301)、全PI3K抑制剂(GDC0941、GDC0942)、MEK/RAF抑制剂(如威罗菲尼(vemurafenib)(RAF抑制剂)、司美替尼(seluemetinib)(MEK抑制剂)、曲美替尼(trametinib)(MEK抑制剂))、PD-1抑制剂、PDL1抑制剂或CTLA4抑制剂。

[0155] 在一个实施例中,αVβ6和/或HER2的至少一种下游靶标的水平被下调。在一个实施例中,Akt2和Smad2中至少一者的水平被下调。在一个实施例中,靶标的总水平被下调。在另一个实施例中,靶标的磷酸化水平被下调。可以通过确定蛋白质水平来测量下调或者可以通过确定mRNA水平来测量下调。下调包括与治疗前相比,至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%的减少。

[0156] 2. 针对卵巢癌的组合疗法

[0157] 组合疗法可以用于卵巢癌肿瘤的治疗中或用于抑制卵巢癌肿瘤细胞的生长。

[0158] 此类方法可以与过表达αVβ6、过表达HER2或过表达αVβ6和HER2的恶性肿瘤或肿瘤细胞的诊断分开使用或者此类方法可以与其组合使用。

[0159] 此类方法可以与过表达αVβ6的恶性肿瘤或肿瘤细胞的诊断分开使用或者此类方法可以与其组合使用。

[0160] 在一个实施例中,卵巢癌细胞对曲妥珠单抗有抗性。因此,一个实施例包括一种抑制抗曲妥珠单抗肿瘤细胞生长的方法,该方法包括向所述细胞给予治疗有效剂量的αVβ6靶向结合剂和HER2靶向结合剂,该αVβ6靶向结合剂特异性地结合至αVβ6并且抑制配体与αVβ6的结合,该HER2靶向结合剂特异性地结合至HER2并且抑制配体与HER2的结合。

[0161] 在一个实施例中,组合治疗剂可以是曲妥珠单抗。

[0162] 在另一个实施例中,组合治疗剂可以是吉西他滨、多西他赛、EGFR抑制剂、HER-2抑制剂(包括但不限于曲妥珠单抗或赫塞汀®)、PI3K抑制剂(ATK抑制剂(如AZD5363、MK2206)、雷帕霉素类似物(rapalogue)(如依维莫司)、AZD2014、PI3K α 抑制剂、PI3K β 抑制剂(AZD8186、GSK2636771、SAR 260301)、全PI3K抑制剂(GDC0941、GDC0942)、MEK/RAF抑制剂(如威罗菲尼(vemurafenib)(RAF抑制剂)、司美替尼(seluemetinib)(MEK抑制剂)、曲美替尼(trametinib)(MEK抑制剂))、PD-1抑制剂、PDL1抑制剂或CTLA4抑制剂。

[0163] 3. 针对胰腺癌的组合疗法

[0164] 组合疗法可以用于胰腺癌肿瘤的治疗中或用于抑制胰腺癌细胞的生长。

[0165] 在一个实施例中,组合治疗剂可以是吉西他滨、白蛋白结合型紫杉醇(abraxane)、亚叶酸钙(folfirinox)(使用5-氟尿嘧啶、奥沙利铂、伊立替康和甲酰四氢叶酸(leucovorin)的组合治疗方法)、EGFR抑制剂、HER-2抑制剂(包括但不限于曲妥珠单抗或赫塞汀®)、PI3K抑制剂(ATK抑制剂(如AZD5363、MK2206)、雷帕霉素类似物(如依维莫司)、AZD2014、PI3K α 抑制剂、PI3K β 抑制剂(AZD8186、GSK2636771、SAR 260301)、全PI3K抑制剂(GDC0941、GDC0942)、MEK/RAF抑制剂(如威罗菲尼(RAF抑制剂)、司美替尼(MEK抑制剂)、曲美替尼(MEK抑制剂))、PD-1抑制剂、PDL1抑制剂或CTLA4抑制剂。

[0166] 4. 针对肺癌的组合疗法

[0167] 组合疗法可以用于肺癌肿瘤的治疗中或用于抑制肺癌细胞生长。在一个实施例中,癌症可以是腺癌、鳞状细胞癌或小细胞肺癌。

[0168] 在一个实施例中,组合治疗剂可以是吉非替尼(Iressa®)、AZD9291、埃罗替尼

(Tarceva®)、基于铂的细胞毒素、多西他赛、PI3K抑制剂 (ATK抑制剂 (如AZD5363、MK2206)、雷帕霉素类似物 (如依维莫司)、AZD2014、PI3K α 抑制剂、PI3K β 抑制剂 (AZD8186、GSK2636771、SAR 260301)、全PI3K抑制剂 (GDC0941、GDC0942))、MEK/RAF抑制剂 (如威罗菲尼 (RAF抑制剂)、司美替尼 (MEK抑制剂)、曲美替尼 (MEK抑制剂))、PD-1抑制剂、PDL1抑制剂或CTLA4抑制剂。

[0169] 5. 针对结直肠癌的组合疗法

[0170] 组合疗法可以用于结直肠癌肿瘤的治疗中或用于抑制结直肠癌细胞的生长。

[0171] 在一个实施例中,组合治疗剂可以是吉西他滨、亚叶酸钙、多西他赛、基于铂的三联剂、5-氟尿嘧啶、西妥昔单抗 (Erbxitux®)、雷帕霉素类似物 (如依维莫司)、ATK抑制剂 (如AZD5363、MK2206)、雷帕霉素类似物 (如依维莫司)、AZD2014、PI3K α 抑制剂、PI3K β 抑制剂 (AZD8186、GSK2636771、SAR 260301)、全PI3K抑制剂 (GDC0941、GDC0942))、MEK/RAF抑制剂 (如威罗菲尼 (RAF抑制剂)、司美替尼 (MEK抑制剂)、曲美替尼 (MEK抑制剂))、PD-1抑制剂、PDL1抑制剂或CTLA4抑制剂。

[0172] 6. 针对头颈癌的组合疗法

[0173] 组合疗法可以用于头颈癌的治疗中或用于抑制头颈癌细胞的生长。

[0174] 在一个实施例中,组合治疗剂可以是吉西他滨、基于铂的细胞毒素、多西他赛、放射、西妥昔单抗 (Erbxitux®)、PI3K抑制剂 (ATK抑制剂 (如AZD5363、MK2206)、雷帕霉素类似物 (如依维莫司)、ATK抑制剂 (如AZD5363、MK2206)、雷帕霉素类似物 (如依维莫司)、AZD2014、PI3K α 抑制剂、PI3K β 抑制剂 (AZD8186、GSK2636771、SAR 260301)、全PI3K抑制剂 (GDC0941、GDC0942))、MEK/RAF抑制剂 (如威罗菲尼 (RAF抑制剂)、司美替尼 (MEK抑制剂)、曲美替尼 (MEK抑制剂))、PD-1抑制剂、PDL1抑制剂或CTLA4抑制剂。

[0175] 7. 针对食管癌的组合疗法

[0176] 组合疗法可以用于食管癌的治疗中或用于抑制食管癌细胞生长。

[0177] 在一个实施例中,组合治疗剂可以是放射或在下文的第II.B.9节中进一步详尽阐述的标准化疗剂。

[0178] 8. 针对胃癌的组合疗法

[0179] 组合疗法可以用于胃癌的治疗中或用于抑制胃癌细胞的生长。

[0180] 在一个实施例中,组合治疗剂可以是三联剂化疗 (紫杉醇、顺铂和S-1)。

[0181] 9. 针对肝细胞癌的组合疗法

[0182] 组合疗法可以用于肝细胞癌的治疗中或用于抑制肝细胞癌细胞的生长。

[0183] 在一个实施例中,组合治疗剂可以是索拉非尼 (sorafenib) 或TACE (TNFa转化酶) 抑制剂。

[0184] 10. 组合疗法概述

[0185] 在此定义的抗肿瘤治疗可以作为唯一疗法应用或者除在此的化合物之外,还可以涉及常规手术或放疗或化疗。

[0186] 这些化合物可以于此的方法中单独地作为单一试剂使用或与其他临床相关的试剂或技术组合使用。例如,在此定义的抗癌治疗可以作为唯一疗法应用或者除在此的化合物之外,还可以涉及常规手术或放疗或化疗。这样的放疗可以包括一种或多种以下类别

的放射：

- [0187] (i) 使用电磁放射的外放射疗法和使用电磁辐射的术中放射疗法；
- [0188] (ii) 内放射疗法或近距放射疗法；包括组织间质放射疗法或腔内放射疗法；或
- [0189] (iii) 全身放射疗法，包括但不限于碘131和锶89；
- [0190] 这样的化疗可以包括一种或多种以下类别的抗肿瘤剂：
 - [0191] 抗增殖/抗肿瘤药及其组合，如在内科肿瘤学中使用的，如DNA烷基化剂（例如顺铂、奥沙利铂、卡铂、环磷酰胺、氮芥、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、替莫唑胺和亚硝基脲）；抗代谢剂（例如吉西他滨、氟达拉滨、卡培他滨和抗叶酸剂如氟嘧啶像5-氟尿嘧啶和培美曲塞、替加氟、雷替曲塞、甲氨蝶呤、阿糖胞苷和羟基脲）；抗肿瘤抗生素（例如蒽环类像阿霉素（adriamycin）、博来霉素、多柔比星（doxorubicin）、多柔比星脂质体、道诺霉素、表柔比星、伊达比星、丝裂霉素-C、更生霉素和光神霉素）；和拓扑异构酶抑制剂（例如表鬼臼毒素像依托泊苷和替尼泊苷、安吖啶、托泊替康、喜树碱和伊立替康）；DNA修复机制的抑制剂，如CHK激酶；DNA依赖性蛋白激酶抑制剂；聚（ADP-核糖）聚合酶抑制剂（PARP抑制剂，包括例如奥拉帕尼（Olaparib））；以及Hsp90抑制剂，如坦螺旋霉素（tanespimycin）和雷他螺旋霉素（retaspimycin）；
 - [0192] 通过细胞周期抑制进展的化合物，如抗有丝分裂剂（例如长春花生物碱像长春新碱、长春碱、长春地辛和长春瑞滨；埃博霉素，如伊沙匹隆和帕妥匹隆；紫杉烷，像紫杉酚和多西他赛；polo样激酶抑制剂；和驱动蛋白动力蛋白抑制剂，如Eg5蛋白抑制剂）；极光激酶抑制剂（例如AZD1152、PH739358、VX-680、MLN8054、R763、MP235、MP529、VX-528和AX39459）；细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂，如CDK2和/或CDK4抑制剂；以及着丝粒蛋白功能抑制剂，如CENP-E抑制剂；
 - [0193] 改变激素依赖性生长的细胞生长抑制剂，如抗雌激素（例如它莫西芬、氟维司群、托瑞米芬、雷洛昔芬、屈洛昔芬和碘昔芬（iodoxyfene）），抗雄激素（例如恩杂鲁胺、比卡鲁胺、氟他胺、尼鲁米特和醋酸环丙孕酮）；LHRH拮抗剂或LHRH激动剂（例如戈舍瑞林、亮丙瑞林和布舍瑞林）；孕激素（例如醋酸甲地孕酮）；芳香酶抑制剂（例如阿那曲唑、来曲唑、伏氯唑（vorazole）和依西美坦）；以及5α-还原酶抑制剂，如非那雄胺；CYP17A1抑制剂，如醋酸阿比特龙；
 - [0194] 抗侵袭剂，如c-Src激酶家族抑制剂像AZD0530、达沙替尼或BMS-354825；博舒替尼（SKI-606），金属蛋白酶抑制剂像马立马司他；尿激酶纤溶酶原活化剂受体功能抑制剂；类肝素酶抗体，FAK或粘着斑激酶抑制剂；MET受体激酶的小分子抑制剂（例如沃利替尼（volitinib））；MET受体激酶或MET配体肝细胞生长因子抗体（例如奥纳妥珠单抗（onartuzumab））；
 - [0195] 肿瘤、肿瘤干细胞和内皮细胞前体迁移抑制剂，包括趋化因子和趋化因子受体，如SDF1、MCP-1、CXCR2和CXCR4；
 - [0196] 生长因子信号传导抑制剂：例如此类抑制剂包括生长因子抗体和生长因子受体抗体（例如抗-erbB2抗体曲妥珠单抗[赫塞汀TM]、抗-EGFR抗体帕尼单抗和西妥昔单抗[Erbiflux, C225]和由斯特恩（Stern）等人（肿瘤学/血液学评论性综述（Critical reviews in oncology/haematology），2005，第54卷，第11-29页）披露的任何生长因子或生长因子受体抗体）；此类抑制剂还包括酪氨酸激酶抑制剂，例如表皮生长因子家族及其受体的抑制剂

(例如EGFR家族酪氨酸激酶抑制剂,如吉非替尼(即ZD1839)、埃罗替尼(即OSI-774)和CI 1033;组合的EGFR和erbB2酪氨酸激酶抑制剂,如拉帕替尼;混合的erbB 1/2抑制剂,如阿法替尼(afatinib);以及EGFR和Her2的不可逆抑制剂如HKI-272,EGFR的不可逆抑制剂如AZD9291;肝细胞生长因子家族及其受体的抑制剂;胰岛素生长因子家族的抑制剂(包括小分子激酶抑制剂和针对胰岛素样生长因子和胰岛素样生长因子受体的抗体;血小板衍生的生长因子家族及其受体的抑制剂,如伊马替尼b和/或尼罗替尼(AMN107);c-kit抑制剂、AnLK抑制剂、Flt3激酶抑制剂、c-abl激酶抑制剂和CSF-1R或TRK激酶抑制剂;

[0197] 信号转导激酶抑制剂,如FGFR(例如AZD4547)、PIM(例如AZD1208)、MEK(例如司美替尼(Selumetinib)(AZD6244))、AKT(例如AZD5363),TOR激酶抑制剂(包括TORC1和TORC2,例如AZD2014)和PI3K激酶抑制剂,包括同工型,如PI3K- α 、PI3K- β 或PI3K- δ (例如AZD8186);丝氨酸/苏氨酸激酶(如Ras或Raf激酶)抑制剂(例如索拉非尼或威罗菲尼);PDK、SGK、PI4K或PIP5K、JAK、STAT(包括STAT3,其抑制剂是AZD9150)和IRAK4的抑制剂;ATR抑制剂(例如AZD6738)或ATM抑制剂;ABL抑制剂如伊马替尼或尼罗替尼,BTK抑制剂如依鲁替尼(ibrutinib),SYK抑制剂如福他替尼(fostamatinib)和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂;法尼基转移酶抑制剂,如替吡法尼(tipifarnib)(R115777)和洛那法尼(lonafarnib)(SCH66336);

[0198] 抗血管生成剂,如抑制血管内皮生长因子的作用的那些[例如抗-血管内皮细胞生长因子抗体贝伐单抗(AvastinTM)和例如,VEGF受体酪氨酸激酶抑制剂如凡德他尼(ZD6474)、索拉非尼、瓦他拉尼(vatalanib)(PTK787)、舒尼替尼(SU11248)、阿西替尼(AG-013736)、帕唑帕尼(GW 786034)和西地尼布(AZD2171);如披露于国际专利申请WO 97/22596、WO 97/30035、WO 97/32856和WO 98/13354中的那些化合物;以及通过其他机制起作用的化合物(例如利诺胺,整合素 α v β 3功能的抑制剂和血管抑素)],或血管生成素及其受体的抑制剂(Tie-1和Tie-2),PLGF抑制剂, δ 样配体抑制剂(DLL-4);

[0199] 血管破坏剂,如康普瑞汀(Combretastatin)A4和国际专利申请WO 99/02166、WO 00/40529、WO 00/41669、WO 01/92224、WO 02/04434和WO 02/08213中披露的化合物;

[0200] 内皮肽受体拮抗剂,如齐泊腾坦(zibotentan)(ZD4054)或阿曲生坦;

[0201] 反义疗法,例如针对以上列出的靶标的那些,如ISIS2503、抗-ras反义物、奥利默森钠、抗-2反义物或XIAP的反义物(如AEG35156);

[0202] 基因治疗方法,包括例如替换异常基因(如异常p53或异常BRCA1或BRCA2)的方法,GDEPT(基因导向酶前药疗法);如使用胞嘧啶脱氨酶、胸苷激酶或细菌硝基还原酶的那些方法;以及增加患者对化疗或放疗的耐受性的方法,如多药耐药基因疗法;

[0203] 免疫治疗方法,包括例如增加患者肿瘤细胞的免疫原性的离体和体内方法,如用细胞因子(如白介素2、白介素4或粒细胞巨噬细胞集落刺激因子)进行转染;减少T细胞无反应性或调节性T细胞功能的方法;增强T细胞对肿瘤的应答的方法,如CTLA4(例如伊匹木单抗和曲美木单抗)、B7H1、PD-1(例如BMS-936558)的阻断性抗体,和CD137的激动剂抗体;使用转染的免疫细胞(如细胞因子转染的树突细胞)的方法;使用细胞因子转染的肿瘤细胞系的方法,使用肿瘤相关抗原的抗体和耗尽靶细胞类型的抗体的方法(例如,未缀合的抗-CD20抗体如利妥昔单抗、放射性标记的抗-CD20抗体百克沙(Bexxar)和泽娃灵(Zevalin)及抗-CD54抗体坎帕斯(Campath));使用抗独特型抗体的方法;增强自然杀伤细胞功能的方

法;以及利用抗体-毒素缀合物(例如抗-CD33抗体麦罗塔(Mylotarg));免疫毒素(如moxetumumab pasudotox); toll样受体7或toll样受体9的激动剂的方法;

[0204] 细胞凋亡诱导的方法,包括死亡受体4或死亡受体5的抗体或结合至死亡受体4和死亡受体5两者的交叉反应性抗体;以及XIAP和cIAP1和cIAP2的抑制剂;FAS的抗体;

[0205] 细胞因子治疗,包括肿瘤坏死因子 α 和重组Tra1蛋白以及Tra1蛋白的小分子或蛋白模拟物;FAS或Tweak配体或这些配体的模拟物;

[0206] 蛋白酶体介导的蛋白质降解的抑制剂,包括但不限于蛋白酶体抑制剂如VelcadeTM、泛素连接酶抑制剂、泛素蛋白酶抑制剂、蛋白质类泛酸化(Neddylation)的抑制剂和蛋白质苏素化的抑制剂;或

[0207] 功效增强剂,如甲酰四氢叶酸。

[0208] 根据再一个实施例,在此提供了包含与选自以上列表的抗肿瘤剂组合的 $\alpha V\beta 6$ 结合剂的试剂盒。在某些实施例中,该试剂盒另外包括用于在癌症的治疗或抑制肿瘤细胞生长中使用所述一种或多种化合物的说明书。

[0209] 根据再一个实施例,提供了一种试剂盒,其包括:

[0210] a) 处于第一单位剂量型的 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂;

[0211] b) 处于第二单位剂量型的选自以上列表的抗肿瘤剂;和

[0212] c) 用于包含所述第一剂型和第二剂型的容器装置。

[0213] III. 诊断方法

[0214] 在一个实施例中,诊断患者体内的对 $\alpha V\beta 6$ 和HER2抑制敏感的乳腺癌的方法包括通过测量 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的表达水平来分析患者样品中过表达 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的肿瘤细胞的存在或不存在,其中如果 $\alpha V\beta 6$ 和HER2两者都被过表达,则该患者被诊断为患有对 $\alpha V\beta 6$ 和HER2抑制敏感的乳腺癌。所谓对抑制敏感,包括将肿瘤或癌细胞进展的任何参数改善至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%,包括但不限于肿瘤生长、肿瘤尺寸、肿瘤攻击或肿瘤侵袭的减少(在患者体内和/或在实验室实验中)和/或延长患者和/或实验室模型的存活;和/或来自下游分子信使的信号传导减少。

[0215] 在另一个实施例中,用于诊断和治疗患者体内的对 $\alpha V\beta 6$ 抑制敏感的癌症的方法包括通过测量 $\alpha V\beta 6$ 的水平来分析患者样品中过表达 $\alpha V\beta 6$ 的癌细胞的存在或不存在,其中如果 $\alpha V\beta 6$ 被过表达,则该患者被诊断为患有对 $\alpha V\beta 6$ 抑制敏感的癌症,并且向确诊患者给予治疗有效剂量的 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂,该 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂特异性地结合至 $\alpha V\beta 6$ 并且抑制配体与 $\alpha V\beta 6$ 的结合。

[0216] 在一个方面中,该方法还包括测量HER2的水平,其中如果HER2被过表达,则该患者被诊断为患有对HER2抑制敏感的癌症。

[0217] 在另一个实施例中,用于诊断和治疗患者体内的对HER2抑制敏感的乳腺癌的方法包括通过测量 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的水平来分析患者样品中过表达 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的乳腺癌细胞的存在或不存在,其中如果 $\alpha V\beta 6$ 和HER2两者都被过表达,则该患者被诊断为患有对 $\alpha V\beta 6$ 和HER2抑制敏感的乳腺癌,并且向确诊患者给予治疗有效剂量的HER2靶向结合剂,该HER2靶向结合剂特异性地结合至HER2并且抑制配体与HER2的结合。

[0218] 另一个实施例包括一种用于诊断和治疗患者体内的对 $\alpha V\beta 6$ 和HER2抑制敏感的乳腺癌的方法,该方法包括通过测量 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的水平来分析患者样品中过表达 $\alpha V\beta 6$ 和HER2

的乳腺癌细胞的存在或不存在,其中如果 $\alpha V\beta 6$ 和HER2两者都被过表达,则该患者被诊断为患有对 $\alpha V\beta 6$ 和HER2抑制敏感的乳腺癌,并且向确诊患者给予治疗有效剂量的 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂和HER2靶向结合剂,该 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂特异性地结合至 $\alpha V\beta 6$ 并且抑制配体与 $\alpha V\beta 6$ 的结合,该HER2靶向结合剂特异性地结合至HER2并且抑制配体与HER2的结合。

[0219] 一个实施例又进一步包括一种用于治疗患者样品中的对 $\alpha V\beta 6$ 抑制敏感的癌症的方法,该方法包括请求测试以确定患者样品是否含有过表达 $\alpha V\beta 6$ 的癌细胞,并且如果该患者样品含有过表达 $\alpha V\beta 6$ 的癌细胞,则给予治疗有效剂量的 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂,该 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂特异性地结合至 $\alpha V\beta 6$ 并且抑制配体与 $\alpha V\beta 6$ 的结合。

[0220] 一个实施例包括一种用于治疗患者样品中的对 $\alpha V\beta 6$ 和HER2抑制敏感的乳腺癌的方法,该方法包括请求测试以确定患者样品是否含有过表达 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的癌细胞,并且如果该患者样品含有过表达 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的癌细胞,则给予治疗有效剂量的:

[0221] a. $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂,其特异性地结合至 $\alpha V\beta 6$ 并且抑制配体与 $\alpha V\beta 6$ 的结合;和

[0222] b.HER2靶向结合剂,其特异性地结合至HER2并且抑制配体与HER2的结合。

[0223] 在一个实施例中,通过测量蛋白质表达来测量表达水平。在一种方法中,通过肿瘤细胞染色的程度和/或肿瘤细胞染色的强度来检测 $\alpha V\beta 6$ 和/或HER2。在一个实施例中, $\alpha V\beta 6$ 和/或HER2是通过肿瘤细胞染色的程度使用评分系统来检测,在该评分系统中0=0%,1=<25%,2=25-50%,3=>50%-75%并且4=>75%。在另一个实施例中, $\alpha V\beta 6$ 和/或HER2是通过肿瘤细胞染色强度得分来检测,所述得分为0=阴性,1=弱,2=中,3=强。在一个实施例中,当在评分中肿瘤细胞染色程度的得分和染色强度的得分加在一起时,如果 $\alpha V\beta 6$ 具有 ≥ 5 的最终得分,则该 $\alpha V\beta 6$ 被定量为过表达。在另一个实施例中,当在评分中肿瘤细胞染色程度的得分和染色强度的得分加在一起时,如果HER2具有 ≥ 5 的最终得分,则该HER2被定量为过表达。在一个实施例中,由多于一位病理学家为每个样品打分并且取这些得分的平均值。

[0224] 在一种方法中,可以通过针对 $\alpha V\beta 6$ 进行染色的IHC样品针对 $\alpha V\beta 6$ 阳性对肿瘤分类,并且然后使用独立的病理学家评分系统,根据0-7染色强度量表(其是0-4百分比阳性,其次是0-3百分比强度的复合体系)将肿瘤分类。从这个量表中,5、6、7的得分被视为强avb6阳性(跨2个肿瘤组群的总样本的大约15.1%和16%),其使用两位能独立的病理学家进行。可以使用结合强度和百分比细胞阳性两者的定标病理学评分系统来确定过表达avb6整合素的肿瘤。使用表示相对于内部对照的每个评分强度的参考样品,将评分系统在样本集之间转移。可替代地,可以使用自动化成像技术,使用参考样品来设置阈值。这些平台通常包括颜色反褶积算法、阳性象元计数,与模式识别软件组合。此类平台的实例包括Aperio Genie^(TM)和Definiens^(TM)自动化图像定量软件包。

[0225] 在另一个实施例中,通过测量mRNA表达来测量表达水平。例如,通过测量ITGB6的mRNA表达来测量 $\alpha V\beta 6$ 表达水平,ITGB6是 $\beta 6$ 亚基的基因。本领域的普通技术人员可以使用其公知常识,使用多种技术(如qRT-PCR、Fluidigm、Nanostring、RNAseq(例如亿明达(Illumina))、昂飞(Affymetrix)基因概况分析)来测量RNA水平并且可以相对于IHC分析对这些水平进行校准以建立适合的评分标准。

[0226] 一种用于诊断患者体内的对 $\alpha V\beta 6$ 抑制敏感的可以通过抑制 $\alpha V\beta 6$ 来治疗的癌症的方法,该方法包括:

[0227] a.从该受试者获得生物样品;

[0228] b. 向该样品中施加特异性地结合至 $\alpha V\beta 6$ 的 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂, 其中 $\alpha V\beta 6$ 的存在产生 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂- $\alpha V\beta 6$ 复合体;

[0229] c. 在以指示 $\alpha V\beta 6$ 过表达的水平检测到步骤b) 中的复合体的情况下, 诊断乳腺癌的攻击性形式。

[0230] 一种用于诊断患者体内的对 $\alpha V\beta 6$ 和HER2抑制敏感的可以通过抑制 $\alpha V\beta 6$ 和HER2治疗的乳腺癌的方法, 该方法包括:

[0231] a. 从该受试者获得生物样品;

[0232] b. 向该样品中施加特异性地结合至 $\alpha V\beta 6$ 的 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂, 其中 $\alpha V\beta 6$ 的存在产生 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂- $\alpha V\beta 6$ 复合体;

[0233] c. 任选地向该样品中施加特异性地结合至HER2的HER2靶向结合剂, 其中HER2的存在产生HER2结合剂-HER2复合体; 并且

[0234] d. 在以指示 $\alpha V\beta 6$ 和HER2过表达的水平检测到步骤b) 和c) 中的复合体的情况下, 诊断乳腺癌的攻击性形式。

[0235] 可以通过本领域众所周知的方法来检测 $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂和 $\alpha V\beta 6$ 的复合体或HER2靶向结合剂和HER2的复合体。在一个实施例中, 可以使用的肿瘤细胞染色的程度和/或肿瘤细胞染色的强度, 如上所述的。在另一个实施例中, 如果靶向结合剂是抗体, 则ELISA测定可以用于测量过表达。可替代地, 可以使用免疫组织化学分析。可替代地, FMAT宏共焦扫描可以用来检测复合体。

[0236] IV. $\alpha V\beta 6$ 靶向结合剂的进一步描述

[0237] 实施例涉及结合至 $\alpha V\beta 6$ 整合素 ($\alpha V\beta 6$) 的靶向结合剂。在一些实施例中, 结合剂结合至 $\alpha V\beta 6$ 并且抑制配体与 $\alpha V\beta 6$ 的结合。在一个实施例中, 靶向结合剂是单克隆抗体或其结合片段。在另一个实施例中, 抗体仅结合至 $\beta 6$ 链, 却能够抑制配体与 $\alpha V\beta 6$ 的结合。

[0238] 其他实施例包括全人抗- $\alpha V\beta 6$ 抗体以及在治疗上有用的抗体制剂。在一个实施例中, 抗- $\alpha V\beta 6$ 抗体制剂具有令人希望的治疗特性, 包括对 $\alpha V\beta 6$ 的强结合亲和力和在体外抑制TGF β LAP介导的细胞粘附的能力。

[0239] 实施例还包括抗- $\alpha V\beta 6$ 抗体的分离的全人结合片段。在一个实施例中, 结合片段衍生自全人抗- $\alpha V\beta 6$ 抗体。示例性片段包括Fv、Fab' 或其他众所周知的抗体片段, 如下文更详细描述的。实施例还包括表达 $\alpha V\beta 6$ 的全人抗体的细胞。细胞的实例包括杂交瘤或重组产生细胞, 如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、CHO细胞变体 (例如DG44) 以及产生 $\alpha V\beta 6$ 抗体的NS0细胞。关于CHO细胞变体的其他信息可以发现于安德森 (Andersen) 和赖利 (Reilly) (2004) 生物技术新见 (Current Opinion in Biotechnology) 15, 456-462中, 将其通过引用以其全文结合在此。

[0240] 此外, 实施例包括使用这些抗体治疗 $\alpha V\beta 6$ 相关疾病或障碍的方法。 $\alpha V\beta 6$ 相关疾病或障碍可以是由于 $\alpha V\beta 6$ 的异常活化或表达引起的任何病症。此类疾病的实例包括 $\alpha V\beta 6$ 与其配体异常地相互作用由此改变细胞粘附或细胞信号传导特性的情况。细胞粘附或细胞信号传导特性的这种改变可以导致肿瘤疾病。其他 $\alpha V\beta 6$ 相关疾病或障碍包括炎性障碍、肺病、与纤维化相关的疾病以及与调节异常的TGF- β 相关的任何疾病。

[0241] 在一个实例中, $\alpha V\beta 6$ 相关疾病是肿瘤疾病, 如黑色素瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、神经胶质瘤、肝细胞 (肝) 癌、甲状腺肿瘤、胃 (gastric, stomach) 癌、前列腺癌、乳腺癌、

卵巢癌、膀胱癌、肺癌、恶性胶质瘤、子宫内膜癌、肾癌、结肠癌、胰腺癌、食管癌、头颈癌、间皮瘤、肉瘤、胆(胆管癌)、小肠腺癌、小儿恶性肿瘤以及表皮样癌。

[0242] 在另一个实例中, $\alpha V\beta 6$ 相关疾病是炎性障碍, 如炎性肠病; 系统性红斑狼疮; 类风湿性关节炎; 幼年型慢性关节炎; 脊椎关节病; 系统性硬化, 例如硬皮病; 特发性炎性肌病, 例如皮肌炎、多肌炎; 干燥综合征; 系统性血管炎; 结节病; 甲状腺炎, 例如格雷夫斯病 (Grave's disease)、桥本甲状腺炎、幼年型淋巴细胞甲状腺炎、萎缩性甲状腺炎; 免疫介导的肾病, 例如肾小球肾炎、肾小管间质性肾炎; 中枢和周围神经系统的脱髓鞘病, 如多发性硬化、特发性多神经病; 肝胆疾病, 如传染性肝炎, 如甲肝、乙肝、丙肝、丁肝和戊肝以及其他非嗜肝病毒; 自身免疫性慢性活动性肝炎; 原发性胆汁性肝硬化; 肉芽肿性肝炎; 和硬化性胆管炎; 炎性和纤维化肺病 (例如, 囊性纤维化); 麦克敏性肠病; 自身免疫性或免疫介导的皮肤疾病, 包括大疱性皮肤病、多形红斑和接触性皮炎、银屑病; 肺的过敏性疾病, 如嗜酸性粒细胞肺炎、特发性肺纤维化、过敏性结膜炎和过敏性肺炎, 移植相关疾病包括移植物排斥和移植物抗宿主疾病。

[0243] 在又另一个实例中, $\alpha V\beta 6$ 相关疾病是纤维化, 如肾或肺纤维化。

[0244] 在又另一个实例中, $\alpha V\beta 6$ 相关疾病与调节异常的 TGF- β 相关, 包括癌症和结缔组织 (纤维化) 疾病。

[0245] 其他实施例包括用于确切地确定生物样品中的 $\alpha V\beta 6$ 的量的诊断测定。测定试剂盒可以包括抗- $\alpha V\beta 6$ 抗体连同用于检测此类抗体的标记。这些诊断测定有用于筛选 αV 相关疾病或 $\beta 6$ 障碍, 包括但不限于肿瘤疾病, 如黑色素瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、神经胶质瘤、肝细胞 (肝) 癌、成胶质细胞瘤以及甲状腺癌、胃癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、肺癌、子宫癌、肾癌、结肠癌和胰腺癌、唾液腺癌和结直肠癌。

[0246] 另一个方面是 $\alpha V\beta 6$ 生物活性的拮抗剂, 其中该拮抗剂结合至 $\alpha V\beta 6$ 。在一个实施例中, 拮抗剂是靶向结合剂, 如抗体。拮抗剂可以结合至:

[0247] i) 单独的 $\beta 6$;

[0248] ii) $\alpha V\beta 6$; 或

[0249] iii) $\alpha V\beta 6$ /配体复合体,

[0250] 或这些的组合。在一个实施例中, 抗体能够在体外和在体内拮抗 $\alpha V\beta 6$ 的生物活性。抗体可以选自全人单克隆抗体, 例如 sc 264RAD、sc 264RAD/ADY、sc 188SDM、sc 133、sc 133TMT、sc 133WDS、sc 133TMT/WDS、sc 188、sc 254、sc 264 或 sc 298 或其变体。

[0251] 在一个实施例中, $\alpha V\beta 6$ 生物活性的拮抗剂可以结合至 $\alpha V\beta 6$ 并且由此阻止 TGF β LAP 介导的细胞粘附。

[0252] 一个实施例是抗体, 其结合至与全人单克隆抗体 sc 264RAD、sc 264RAD/ADY、sc 188SDM、sc 133、sc 133TMT、sc 133WDS、sc 133TMT/WDS、sc 188、sc 254、sc 264 或 sc 298 所结合表位相同的一个或多个表位。

[0253] 在一个实施例中, 靶向结合剂以小于 100 纳摩尔 (nM) 的 K_d 结合 $\alpha V\beta 6$ 。靶向结合剂能以小于约 35 纳摩尔 (nM) 的 K_d 结合。靶向结合剂能以小于约 25 纳摩尔 (nM) 的 K_d 结合。靶向结合剂能以小于约 10 纳摩尔 (nM) 的 K_d 结合。在另一个实施例中, 靶向结合剂以小于约 60 皮摩尔 (pM) 的 K_d 结合。

[0254] 一个实施例是产生如在上文描述的抗体的轻链和/或重链的抗体分泌浆细胞。在

一个实施例中,浆细胞产生全人单克隆抗体的轻链和/或重链。在另一个实施例中,浆细胞产生全人单克隆抗体sc 264RAD、sc 264RAD/ADY、sc 188SDM、sc 133、sc 133TMT、sc 133WDS、sc 133TMT/WDS、sc 188、sc 254、sc 264或sc 298的轻链和/或重链。可替代地,浆细胞可以产生抗体,其结合至与全人单克隆抗体sc 264RAD、sc 264RAD/ADY、sc 188SDM、sc 133、sc 133TMT、sc 133WDS、sc 133TMT/WDS、sc 188、sc 254、sc 264或sc 298所结合表位相同的一个或多个表位。

[0255] 另一个实施例是编码如在上文描述的抗体的轻链或重链的核酸分子。在一个实施例中,核酸分子编码全人单克隆抗体的轻链或重链。仍另一个实施例是编码选自以下抗体的全人单克隆抗体的轻链或重链的核酸分子:sc 264RAD、sc 264RAD/ADY、sc 188SDM、sc 133、sc 133TMT、sc 133WDS、sc 133TMT/WDS、sc 188、sc 254、sc 264或sc 298。

[0256] 另一个实施例是包含如在上文描述的一个或多个核酸分子的载体,其中该载体编码如在上文定义的抗体的轻链和/或重链。

[0257] 又另一个实施例是包含如在上文描述的载体的宿主细胞。可替代地,宿主细胞可以包括多于一个的载体。

[0258] 此外,一个实施例是一种产生抗体的方法,通过在核酸分子被表达以产生该抗体的条件下培养宿主细胞,随后回收该抗体。

[0259] 一个实施例包括一种制备抗体的方法,通过用如在上文所述的至少一个编码该抗体的核酸分子转染至少一个宿主细胞,在该宿主细胞中表达该核酸分子并且分离该抗体。

[0260] 另一个方面包括一种拮抗 $\alpha V\beta 6$ 生物活性的方法,该方法包括给予如在此描述的拮抗剂。该方法可以包括选择需要治疗 $\alpha V\beta 6$ 相关疾病或障碍的动物,并且向该动物给予治疗有效剂量的 $\alpha V\beta 6$ 生物活性的拮抗剂。

[0261] 另一个方面包括一种拮抗 $\alpha V\beta 6$ 生物活性的方法,该方法包括给予如在上文描述的抗体。该方法可以包括选择需要治疗 $\alpha V\beta 6$ 相关疾病或障碍的动物,并且向所述动物给予治疗有效剂量的拮抗 $\alpha V\beta 6$ 生物活性的抗体。

[0262] 根据另一个方面,提供了一种治疗哺乳动物的 $\alpha V\beta 6$ 相关疾病或障碍的方法,该方法包括给予治疗有效剂量的 $\alpha V\beta 6$ 生物活性的拮抗剂。该方法可以包括选择需要治疗 $\alpha V\beta 6$ 相关疾病或障碍的动物,并且向所述动物给予治疗有效剂量的 $\alpha V\beta 6$ 生物活性的拮抗剂。

[0263] 根据另一个方面,提供了一种治疗哺乳动物的 $\alpha V\beta 6$ 疾病或障碍的方法,该方法包括给予治疗有效剂量的拮抗 $\alpha V\beta 6$ 生物活性的抗体。该方法可以包括选择需要治疗 $\alpha V\beta 6$ 相关疾病或障碍的动物,并且向所述动物给予治疗有效剂量的拮抗 $\alpha V\beta 6$ 生物活性的抗体。抗体可以单独给予,或者可以与另外的抗体或化疗药物或放射疗法组合给予。

[0264] 根据另一个方面,提供了一种治疗哺乳动物的癌症的方法,该方法包括给予治疗有效剂量的 $\alpha V\beta 6$ 生物活性的拮抗剂。该方法可以包括选择需要治疗癌症的动物,并且向所述动物给予治疗有效剂量的拮抗 $\alpha V\beta 6$ 生物活性的拮抗剂。拮抗剂可以单独给予,或者可以与另外的抗体或化疗药物或放射疗法组合给予。

[0265] 根据另一个方面,提供了一种治疗哺乳动物的癌症的方法,该方法包括给予治疗有效剂量的拮抗 $\alpha V\beta 6$ 生物活性的抗体。该方法可以包括选择需要治疗癌症的动物,并且向所述动物给予治疗有效剂量的拮抗 $\alpha V\beta 6$ 生物活性的抗体。抗体可以单独给予,或者可以与另外的抗体或化疗药物或放射疗法组合给予。

[0266] 根据另一个方面,提供了 $\alpha V\beta 6$ 生物活性的拮抗剂用于制造治疗 $\alpha V\beta 6$ 相关疾病或障碍用的药剂的用途。

[0267] 根据另一个方面,提供了拮抗 $\alpha V\beta 6$ 生物活性的抗体用于制造治疗 $\alpha V\beta 6$ 相关疾病或障碍用的药剂的用途。

[0268] 一个实施例特别适于在具有肿瘤的患者体内拮抗 $\alpha V\beta 6$,所述肿瘤单独地或部分地依赖于 $\alpha V\beta 6$ 整合素。

[0269] 另一个实施例包括用于检测哺乳动物组织、细胞或体液中的 $\alpha V\beta 6$ 以便筛选 $\alpha V\beta 6$ 相关疾病或障碍的测定试剂盒。试剂盒包括结合至 $\alpha V\beta 6$ 的抗体和用于指示该抗体与 $\alpha V\beta 6$ (如果存在的话)的反应的装置。抗体可以是单克隆抗体。在一个实施例中,结合 $\alpha V\beta 6$ 的抗体被标记。在另一个实施例中,抗体是未标记的一级抗体并且试剂盒进一步包括用于检测该一级抗体的装置。在一个实施例中,装置包括作为抗免疫球蛋白的标记的第二抗体。在一个方面中,用选自荧光染料、酶、放射性核素和不透射线材料的标志物标记抗体。

[0270] 关于抗- $\alpha V\beta 6$ 抗体的另外的实施例、特征等更加详细地提供于下文中。

[0271] A. 人抗体与抗体的人源化

[0272] 人抗体避免了一些与具有小鼠或大鼠可变区和/或恒定区的抗体相关的问题。这种鼠类或大鼠源性蛋白质的存在可以导致抗体的快速清除或可以导致患者产生针对该抗体的免疫应答。为了避免小鼠或大鼠衍生的抗体的使用,可以通过将功能性人抗体基因座引入啮齿类动物、其他哺乳动物或动物而产生全人抗体,使得该啮齿类动物、其他哺乳动物或动物产生全人抗体。

[0273] 一种用于产生全人抗体的方法是通过使用 XenoMouse[®] 小鼠品系,其已经被工程化为含有高达但小于1000kb大小的人重链基因座和 κ 轻链基因座的种系配置的片段。参见门德斯(Mendez)等人,自然遗传学(Nature Genetics)15:146-156(1997)以及格伦(Green)和雅克博维茨(Jakobovits)实验医学杂志(J.Exp.Med.)188:483-495(1998)。

XenoMouse[®]品系可从安进公司(Amgen, Inc.) (弗里蒙特,加利福尼亚州)获得。

[0274] XenoMouse[®]小鼠品系的产生进一步讨论和描绘于以下美国专利申请系列号:提交于1990年1月12日的07/466,008、提交于1990年11月8日的07/610,515、提交于1992年7月24日的07/919,297、提交于1992年7月30日的07/922,649、提交于1993年3月15日的08/031,801、提交于1993年8月27日的08/112,848、提交于1994年4月28日的08/234,145、提交于1995年1月20日的08/376,279、提交于1995年4月27日的08/430,938、提交于1995年6月5日的08/464,584、提交于1995年6月5日的08/464,582、提交于1995年6月5日的08/463,191、提交于1995年6月5日的08/462,837、提交于1995年6月5日的08/486,853、提交于1995年6月5日的08/486,857、提交于1995年6月5日的08/486,859、提交于1995年6月5日的08/462,513、提交于1996年10月2日的08/724,752、提交于1996年12月3日的08/759,620,提交于2001年11月30日的美国公开2003/0093820以及美国专利号6,162,963、6,150,584、6,114,598、6,075,181和5,939,598及日本专利号3 068 180 B2、3 068 506 B2和3 068 507 B2中。还参见授予公开于1996年6月12日的欧洲专利号EP 0 463 151 B1、公开于1994年2月3日的国际专利申请号W0 94/02602、公开于1996年10月31日的国际专利申请号W0 96/34096、公开于1998年6月11日的W0 98/24893、公开于2000年12月21日的W0 00/76310。以上

引用的专利、申请和参考文献中的每者的披露均以其全文通过引用而特此结合。

[0275] 在一种替代性方法中，其他机构（包括杰珐姆国际公司（GenPharm International, Inc.））已经利用了“微基因座(minilocus)”方法。在微基因座方法中，通过包含来自 Ig 基因座的碎片（单独的基因）来模拟一个外源 Ig 基因座。因此，一个或多个 V_H 基因、一个或多个 D_H 基因、一个或多个 J_H 基因、μ 恒定区以及通常第二恒定区（任选地是 γ 恒定区）形成在用于插入动物体内的构建体之中。这种方法描述于属于苏拉尼（Surani）等人的美国专利号 5,545,807，以及全部属于兰伯格（Lonberg）和凯（Kay）的美国专利号 5,545,806、5,625,825、5,625,126、5,633,425、5,661,016、5,770,429、5,789,650、5,814,318、5,877,397、5,874,299 和 6,255,458，属于克里木宾福特（Krimpenfort）和伯恩斯（Berns）的美国专利号 5,591,669 和 6,023,010，属于伯恩斯等人的美国专利号 5,612,205、5,721,367 和 5,789,215，以及属于崔（Choi）和邓恩（Dunn）的美国专利号 5,643,763，以及以下杰珐姆国际的美国专利申请序列号：提交于 1990 年 8 月 29 日的 07/574,748、提交于 1990 年 8 月 31 日的 07/575,962、提交于 1991 年 12 月 17 日的 07/810,279、提交于 1992 年 3 月 18 日的 07/853,408、提交于 1992 年 6 月 23 日的 07/904,068、提交于 1992 年 12 月 16 日的 07/990,860、提交于 1993 年 4 月 26 日的 08/053,131、提交于 1993 年 7 月 22 日的 08/096,762、提交于 1993 年 11 月 18 日的 08/155,301、提交于 1993 年 12 月 3 日的 08/161,739、提交于 1993 年 12 月 10 日的 08/165,699、提交于 1994 年 3 月 9 日的 08/209,741 中，将其披露通过引用而特此结合。还参见欧洲专利号 0 546 073 B1，国际专利申请号 WO 92/03918、WO 92/22645、WO 92/22647、WO 92/22670、WO 93/12227、WO 94/00569、WO 94/25585、WO 96/14436、WO 97/13852 和 WO 98/24884 以及美国专利号 5,981,175，将其披露以其全文通过引用而特此结合。进一步参见泰勒（Taylor）等人，1992；陈（Chen）等人，1993；图爱伦（Tuailion）等人，1993；崔（Choi）等人，1993；兰伯格（Lonberg）等人，（1994）；泰勒等人，（1994）以及图爱伦等人，（1995）；菲施维尔德（Fishwild）等人，（1996），将其披露以其全文通过引用而特此结合。

[0276] 克利宁（Kirin）还已经证明自小鼠产生人抗体，在所述小鼠中已经通过微细胞融合而引入大片的染色体或整个染色体。参见欧洲专利申请号 773 288 和 843 961，将其披露通过引用而特此结合。另外，已经产生 KMTM- 小鼠，这些小鼠是克利宁的 Tc 小鼠与 Medarex 的微基因座（Humab）小鼠进行杂交育种的结果。这些小鼠具有克利宁小鼠的人 IgH 转染色体和杰珐姆小鼠的 κ 链转基因（石田（Ishida）等人，克隆干细胞（Cloning Stem Cells），（2002）4:91-102）。

[0277] 还可以通过体外方法衍生人抗体。适合的实例包括但不限于噬菌体展示（CAT、莫弗西斯公司（Morphosys）、Dyax、Biosite/Medarex、Xoma、Sympogen、亚力兄公司（以前为 Proliferon）、Affimed），核糖体展示（CAT）、酵母展示等。

[0278] B. 抗体的制备

[0279] 如在此描述的抗体通过利用 XenoMouse[®] 技术来制备，如下文所述的。然后这些小鼠能够产生人免疫球蛋白分子和抗体并且在产生鼠类免疫球蛋白分子和抗体方面有所不足。用于实现其的技术披露于在此的背景部分中披露的专利、申请和参考文献中。然而，具体而言，小鼠的转基因产生以及来自其中的抗体的实施例披露于提交于 1996 年 12 月 3 日的美国专利申请序列号 08/759,620 以及公开于 1998 年 6 月 11 日的国际专利申请号 WO 98/24893 和公开于 2000 年 12 月 21 日的 WO 00/76310 中，将其披露通过引用而特此结合。还参见

门德斯(Mendez)等人,自然遗传学(Nature Genetics)15:146-156(1997),将其披露通过引用而特此结合。

[0280] 通过使用这种技术,已经产生了多种抗原的全人单克隆抗体。基本上,用感兴趣的抗原(例如 $\alpha V\beta 6$)免疫**XenoMouse®**小鼠系,从超免疫小鼠体内回收淋巴细胞(如B细胞),并且将回收的淋巴细胞与髓系(myeloid-type)细胞系融合,从而制备永生杂交瘤细胞系。将这些杂交瘤细胞系进行筛选并且选择以便鉴定产生对感兴趣的抗原具有特异性的抗体的杂交瘤细胞系。在此提供了用于产生多种杂交瘤细胞系的方法,所述杂交瘤细胞系产生对 $\alpha V\beta 6$ 具有特异性的抗体。此外,在此提供了由此类细胞系产生的抗体的表征,包括此类抗体的重链和轻链的核苷酸和氨基酸序列分析。

[0281] 可替代地,不与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤,而可以直接测定B细胞。例如,可以从超免疫**XenoMouse®**小鼠体内分离CD19+B细胞并且允许其增殖并分化成抗体分泌浆细胞。然后通过ELISA针对与 $\alpha V\beta 6$ 免疫原的反应性从细胞上清液中筛选抗体。也可以针对与 $\alpha V\beta 6$ 片段的免疫反应性对上清液进行筛选,以进一步针对与 $\alpha V\beta 6$ 上的感兴趣的功能域的结合来标绘不同抗体。还可以针对其他相关人整合素以及针对 $\alpha V\beta 6$ 的大鼠、小鼠和非人灵长类(如食蟹猴)直系同源物对抗体进行筛选,最后确定物种交叉反应性。可以通过多种方法使来自含有感兴趣的抗体的孔的B细胞永生化,包括融合,以从单独或从合并孔制备杂交瘤,或者通过用EBV进行感染或者通过已知的永生化基因进行转染,然后铺在适合的培养基中。可替代地,然后使用 $\alpha V\beta 6$ 特异性溶血空斑测定分离分泌具有希望的特异性的抗体的单一浆细胞(参见例如巴布科克(Babcock)等人,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)93:7843-48(1996))。用于裂解的细胞可以是用 $\alpha V\beta 6$ 抗原包被的绵羊红细胞(SRBC)。

[0282] 在含有分泌感兴趣的免疫球蛋白和补体的浆细胞的B细胞培养物的存在下,空斑的形成指示感兴趣的浆细胞周围的绵羊红细胞进行 $\alpha V\beta 6$ 介导的特异性裂解。可以分离出空斑中心的单一抗原特异性浆细胞并且从该单一浆细胞分离出编码抗体特异性的遗传信息。使用逆转录随后使用PCR(RT-PCR),可以克隆编码抗体的重链和轻链可变区的DNA。然后可以进一步将这种克隆的DNA插入含有免疫球蛋白重链和轻链的恒定域的适合的表达载体、载体盒(如pcDNA)或pcDNA载体中。然后可以将产生的载体转染进宿主细胞(例如,HEK293细胞、CHO细胞)中,并且在适当地被修饰用于诱导转录、选择转化体或扩增编码希望的序列的基因的常规营养培养基中进行培养。

[0283] 通常,由融合的杂交瘤产生的抗体是人IgG2重链与全人 κ 或 λ 轻链。在此所述的抗体具有人IgG4重链连同IgG2重链。抗体还可以属于其他人类同种型,包括IgG1。当通过固相和液相技术测量时,抗体具有高亲和力,典型地具有从约 10^{-6} 至约 10^{-12} M或之下的Kd。具有至少 10^{-11} M的Kd的抗体可以抑制 $\alpha V\beta 6$ 的活性。

[0284] 如应理解的,可以在除杂交瘤细胞系之外的细胞系中表达抗体。编码特定抗体的序列可以用来转化适合的哺乳动物宿主细胞。转化可以通过用于将多核苷酸引入宿主细胞(包括例如将多核苷酸包装在病毒(或包装进病毒载体中))中并且用该病毒(或载体)转导宿主细胞的任何已知方法或通过本领域已知的转染程序,如通过美国专利号4,399,216、4,912,040、4,740,461和4,959,455(将这些专利通过引入而特此结合在此)示例的。所使用的转化程序取决于待转化的宿主。用于将异源多核苷酸引入哺乳动物细胞的方法在本领域是

众所周知的并且包括葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺介导的转染、原生质体融合、电穿孔、将一个或多个多核苷酸包囊在脂质体中以及将DNA直接微注射进核中。

[0285] 作为表达用宿主的可获得的哺乳动物细胞系在本领域是众所周知的，并且包括许多可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的永生化细胞系，包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、海拉细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如,Hep G2)、人上皮肾293细胞以及多种其他细胞系。可以通过确定哪些细胞系具有高表达水平并且产生具有组成性 $\alpha V\beta 6$ 结合特性的抗体来选择细胞系。

[0286] 基于mAb显著中和 $\alpha V\beta 6$ 活性的能力(如在下文的实例中展示的)，这些抗体将在治疗由 $\alpha V\beta 6$ 表达引起的症状和病症中具有治疗效果。在特定实施例中，在此的抗体和方法涉及治疗由 $\alpha V\beta 6$ 诱导的细胞粘附或作为 $\alpha V\beta 6$ 与其配体相互作用的结果而诱导的信号传导引起的症状。

[0287] 根据另一个方面，提供了包含 $\alpha V\beta 6$ 生物活性的拮抗剂和药学上可接受的载体的药物组合物。在一个实施例中，拮抗剂包括抗体。根据另一个方面，提供了包含 $\alpha V\beta 6$ 生物活性的拮抗剂和药学上可接受的载体的药物组合物。在一个实施例中，拮抗剂包括抗体。

[0288] 抗- $\alpha V\beta 6$ 抗体可用于检测患者样品中的 $\alpha V\beta 6$ 并且因此作为如在此描述的疾病状态的诊断剂是有用的。此外，基于它们显著抑制 $\alpha V\beta 6$ 活性的能力(如在下文的实例中展示的)，抗- $\alpha V\beta 6$ 抗体在治疗由 $\alpha V\beta 6$ 表达引起的症状和病症中具有治疗效果。在特定实施例中，在此的抗体和方法涉及治疗由 $\alpha V\beta 6$ 诱导的细胞粘附引起的症状。另外的实施例涉及使用在此描述的抗体和方法治疗 $\alpha V\beta 6$ 相关疾病或障碍，包括肿瘤疾病，如黑色素瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、神经胶质瘤、肝细胞(肝)癌、甲状腺肿瘤、胃(gastric,stomach)癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、肺癌、恶性胶质瘤、子宫内膜癌、肾癌、结肠癌以及胰腺癌。

[0289] C. 治疗给药与配制品

[0290] 实施例包括作为疾病的治疗有用的抗- $\alpha V\beta 6$ 抗体的无菌药物配制品。此类配制品将抑制配体与 $\alpha V\beta 6$ 整合素的结合，由此有效治疗例如组织 $\alpha V\beta 6$ 异常升高的病理学病症。抗- $\alpha V\beta 6$ 抗体可以具有足够的亲和力以有效抑制 $\alpha V\beta 6$ 活性，并且可以具有足够的作用持续时间以允许在人类中不频繁的给药。延长的作用持续时间将允许通过交替胃肠外途径(如皮下或肌内注射)的更不频繁的且更方便的给药方案。

[0291] 无菌配制品可以例如通过在冷干和重构抗体之前或之后用无菌过滤膜过滤而产生。抗体通常以冻干形式储存或者以溶液储存。通常将治疗抗体组合物置于具有无菌存取口的容器中，例如，静脉内输液袋或具有允许收回配制品的接头(如皮下注射针头可穿透的塞子)的小药瓶。

[0292] 抗体的给予途径与已知方法一致，例如，通过静脉内、腹膜内、脑内、肌内、眼内、动脉内、鞘内、吸入或病灶内途径注射或输注，直接注入肿瘤部位或者通过如下所述的缓释系统。抗体可以通过输注或通过单次快速静脉注射连续给予。

[0293] 待在治疗上采用的抗体的有效量将取决于例如治疗目的、给药途径和患者的状况。因此，治疗师可以确定剂量并且修改给药途径以获得最佳治疗效果。在一个方面中，临床医师将给予抗体直至达到实现所希望的效果的剂量。通过常规测定或通过在此描述的测定容易地监测这种疗法的进程。

[0294] 如在此描述的抗体可以与药学上可接受的载体一起被制备在混合物中。这种治疗

组合物可以静脉内或通过鼻或肺,任选地作为液体或粉末气雾剂(冻干的)给予。按照需要,组合物还可以胃肠外或皮下给予。当全身给药时,治疗组合物应当是无菌的、无热原的并且应适当考虑pH、等渗性和稳定性在胃肠外可接受的溶液中。这些条件是本领域的普通技术人员已知的。简言之,制备在此描述的化合物的剂量配制品用于储存或通过将具有希望的纯度的化合物与药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合来给予。此类材料在所用的剂量和浓度下对接受者而言是无毒的,并且包括缓冲液,如TRIS HC1、磷酸盐、柠檬酸盐、醋酸盐以及其他有机酸盐;抗氧化剂,如抗坏血酸;低分子量(小于约十个残基)肽,如聚精氨酸、蛋白质如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸或精氨酸;单糖、二糖以及其他碳水化合物包括纤维素或其衍生物、葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖醇,如甘露醇或山梨醇;抗衡离子如钠和/或非离子表面活性剂如TWEEN、PLURONICS或聚乙二醇。

[0295] 用于注射的无菌组合物可以根据如雷明顿:药物科学与实践(Remington: The Science and Practice of Pharmacy)(第20版,利平科特威廉斯威尔金斯出版公司(Lippincott Williams&Wilkins Publishers)(2003))中描述的常规药学实践来配制。例如,活性化合物在药学上可接受的载体(如水或天然存在的植物油像芝麻油、花生油或棉籽油或合成的脂肪载体像油酸乙酯等)中溶解或悬浮可以是所希望的。可以根据公认的制药实践来掺入缓冲液、防腐剂、抗氧化剂等。

[0296] 缓释制剂的适合实例包括含有多肽的固体疏水性聚合物的半透性基质,这些基质处于成型的物品、薄膜或微胶囊的形式。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟基乙基-甲基丙烯酸酯),如由兰格(Langer)等人,生物医学材料研究杂志(J. Biomed Mater. Res.), (1981) 15:167-277和兰格,化学技术(Chem. Tech.), (1982) 12:98-105所描述,或聚(乙烯醇)、聚乳酸(美国专利号3,773,919、EP 58,481)、L-谷氨酸和 γ 乙基-L-谷氨酸的共聚物(西德曼(Sidman)等人,生物聚合物(Biopolymers), (1983) 22:547-556)、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯(兰格等人,同上)、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如LUPRON DepotTM(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球)以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸(EP 133,988)。

[0297] 虽然聚合物(如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸)使得分子能够释放超过100天,但是某些水凝胶在较短的时间段内释放蛋白质。当包囊的蛋白质长时间留在体内时,它们可能因在37°C下暴露于水分而变性或凝集,导致生物活性的丧失和可能的免疫原性变化。可以根据涉及的机制来设计合理的策略以使蛋白质体稳定。例如,如果发现凝集机制是因二硫化物交换所致的分子内S-S键形成,可以通过修饰硫氨基残基、从酸性溶液冻干、控制水分含量、使用适当的添加剂以及开发特定的聚合物基质组合物来实现稳定。

[0298] 抗体还涵盖在哺乳动物(任选地人)体内具有比未修饰抗体的半衰期长的半衰期(例如,血清半衰期)的抗体。在一个实施例中,所述抗体半衰期超过15天,超过20天、超过25天、超过30天、超过35天、超过40天、超过45天、超过2个月、超过3个月、超过4个月或超过5个月。在哺乳动物(优选地人)体内的在此的抗体或其片段的增加的半衰期导致在该哺乳动物体内所述抗体或抗体片段的血清滴度更高,并且因此减少给予所述抗体或抗体片段的频度和/或减少待给予的所述抗体或抗体片段的浓度。具有增加的体内半衰期的抗体或其片段可以通过本领域的普通技术人员已知的技术产生。例如,具有增加的体内半衰期的抗体或

其片段可以通过修饰(例如,取代、缺失或添加)多个鉴别为涉及到Fc域与FcRn受体之间的相互作用中的氨基酸残基来产生(参见例如,国际公开号WO 97/34631和WO 02/060919,将其通过引用以其全文结合在此)。具有增加的体内半衰期的抗体或其片段可以通过将多聚体分子诸如高分子量聚乙二醇(PEG)附接至所述抗体或抗体片段来产生。PEG可以在存在或不存在多官能接头的情况下,通过PEG与所述抗体或抗体片段的N-末端或C-末端的位点特异性缀合或经由赖氨酸残基上存在的ε-氨基基团附接到所述抗体或抗体片段。将使用导致生物活性最少损失的线性或分支的聚合物衍生化。可通过SDS-PAGE和质谱密切监测缀合的程度,来确保PEG分子与抗体的正确缀合。可以通过例如尺寸排阻或离子交换色谱来从抗体PEG缀合物中分离未反应的PEG。

[0299] 缓释组合物还包括悬浮于适合的配制品中能够在悬浮液中维持晶体的抗体的晶体制剂。当皮下或腹膜内注射时,这些制剂可以产生缓释效果。其他组合物还包括脂质体包封的抗体。含有此类抗体的脂质体通过本身已知的方法来制备:美国专利号DE 3,218,121;爱普斯坦(Epstein)等人,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA), (1985) 82: 3688-3692;黄(Hwang)等人,美国国家科学院院刊,(1980) 77:4030-4034;EP 52,322;EP 36,676;EP 88,046;EP 143,949;142,641;日本专利申请83-118008;美国专利号4,485,045和4,544,545;以及EP 102,324。

[0300] 针对给定患者的抗体配制品的剂量将通过主治医师考虑已知的多种因素来确定以修改药物的作用,所述因素包括疾病的严重程度和类型、体重、性别、饮食、给药时间和途径、其他药物治疗以及其他相关临床因素。治疗有效剂量可以通过体外或体内方法来确定。

[0301] 待在治疗上采用的在此描述的抗体的有效量将取决于例如治疗目的、给药途径和患者的状况。因此,治疗师可以根据需要确定剂量并且修改给药途径以获得最佳治疗效果。典型的日剂量范围可能是从约0.001mg/kg至高达100mg/k或更多,取决于上文提到的因素。典型地,临床医师将给予治疗抗体直至达到实现所希望的效果的剂量。通过常规测定或如在此描述的容易地监测这种疗法的进程。

[0302] 应当理解的是,根据在此的组合物和方法的治疗实体的给予将与被掺入配制品中的适合的载体、赋形剂以及其他试剂一起给予,以提供改进的传递、递送、耐受等。这些配制品包括例如粉剂、糊剂、软膏剂、凝胶剂、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子的或阴离子的)囊泡(如LipofectinTM)、DNA缀合物、无水吸收糊剂、水包油型和油包水型乳液、乳液聚乙二醇(不同分子量的聚乙二醇)、半固态凝胶以及含聚乙二醇的半固态混合物。任何前述混合物在治疗和疗法中都可以是适当的,其条件是配制品中的活性成分未被配制品失活并且配制品是生理上相容的并且是给药途径所容许的。还参见鲍德里克P.(Baldrick P.)“药物赋形剂发展:临床前指导的必要性(Pharmaceutical excipient development:the need for preclinical guidance).”监管毒理学和药理学(Regul.Toxicol.Pharmacol.)32(2):210-8(2000);王W.(Wang W.)“固态蛋白质药物的冻干与开发(Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals).”国际药物杂志(Int.J.Pharm.)203(1-2):1-60(2000);查尔曼WN(Charman WN)“脂质、亲脂性药物和口服药物一些新兴概念(Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts).”药物科学杂志(J Pharm Sci).89(8):967-78(2000);鲍威尔(Powell)等人,“胃肠外制剂的赋形剂纲要(Compendium of excipients for parenteral formulations)”PDA药物科学与技

术杂志(PDA J Pharm Sci Technol.) 52:238–311 (1998) 和其中与配制品、赋形剂和载体有关的药剂师众所周知的的另外信息的引文。

[0303] D. 其他治疗剂的设计与产生

[0304] 根据本发明实施例和基于在此关于 $\alpha V\beta 6$ 产生和表征的抗体的活性,有助于除抗体部分之外的其它治疗模式的设计。此类模式包括但不限于高级抗体治疗剂,如双特异性抗体、免疫毒素和放射性标记的治疗剂、单域抗体、肽治疗剂的产生、新型支架中的 $\alpha V\beta 6$ 结合域、基因疗法,特别是胞内抗体、反义治疗剂和小分子。

[0305] 关于高级抗体治疗剂的产生,其中补体固定是希望的属性,通过例如双特异性抗体、免疫毒素或放射性标记的使用使细胞杀伤避开对补体的依赖是可能的。

[0306] 可以产生以下双特异性抗体,其包括(i)两个缀合在一起的抗体,一个对 $\alpha V\beta 6$ 具有特异性并且另一个对第二分子具有特异性;(ii)单一抗体,其具有一条对 $\alpha V\beta 6$ 有特异性的链和对第二分子有特异性的第二链;或(iii)单链抗体,其对 $\alpha V\beta 6$ 和另一分子具有特异性。此类双特异性抗体可以使用众所周知的技术来产生;例如,关于(i)和(ii)参见例如,范格尔(Fanger)等人,免疫学方法(Immunol Methods) 4:72–81 (1994) 以及赖特(Wright)和哈里斯(Harris),同上并且关于(iii)参见例如特劳内克尔(Traunecker)等人,国际癌症杂志(Int.J.Cancer) (增刊) 7:51–52 (1992)。在每种情况中,第二特异性可以针对重链活化受体来产生,包括但不限于CD16或CD64(参见例如,德奥(Deo)等人,今日免疫学(Immunol.Today) 18:127 (1997))或CD89(参见例如,艾来瑞斯(alerius)等人,血液(Blood) 90:4485–4492 (1997))。

[0307] 关于免疫毒素,可以利用本领域众所周知的技术修饰抗体以充当免疫毒素。参见例如,维特塔(Vitetta)今日免疫学(Immunol Today) 14:252 (1993)。还参见美国专利号5,194,594。关于放射性标记的抗体的制备,还可以利用本领域众所周知的技术容易地制备此类修饰抗体。参见例如,荣汉斯(Junghans)等人,在癌症化疗与生物疗法(Cancer Chemotherapy and Biotherapy) 655–686 (第二版,查福尼尔(Chafner)和隆戈(Longo)编辑,利平科特瑞文(Lippincott Raven) (1996))中。还参见美国专利号4,681,581、4,735,210、5,101,827、5,102,990 (RE 35,500)、5,648,471以及5,697,902。

[0308] 抗原结合位点可以通过在如纤连蛋白或细胞色素B等非抗体蛋白支架上排列CDR来提供(哈恩(Haan)&麦格思(Maggos) (2004) 生物世纪(BioCentury), 12 (5) :A1–A6; 小出(Koide)等人,(1998) 分子生物学杂志(Journal of Molecular Biology), 284:1141–1151; 尼格伦(Nygren)等人,(1997) 结构生物学新见(Current Opinion in Structural Biology), 7:463–469) 或者通过通过随机化或突变蛋白支架内的环的氨基酸残基以赋予希望的靶标的结合特异性。蛋白质中用于工程化新颖结合位点的支架已经详细地由尼格伦(Nygren)等人(尼格伦等人,(1997) 结构生物学新见(Current Opinion in Structural Biology), 7:463–469) 综述。抗体模拟物的蛋白支架披露于以其全部内容通过引用结合在此的WO/0034784中,其中发明人描述包括具有至少一个随机环的纤连蛋白III型域的蛋白质(抗体模拟物)。将一个或多个CDR(例如一套HCDR)嫁接到其中的适合的支架可以通过免疫球蛋白基因超家族的任何域成员来提供。支架可以是人的或非人的蛋白质。非抗体蛋白支架的优势是它可在支架分子中提供比至少一些抗体分子更小且/或更容易制造的抗原结合位点。结合剂的小尺寸可以赋予有用的生理特性,如进入细胞、渗透深入到组织或到达其

他结构内的靶标或与靶抗原的蛋白质腔内结合的能力。非抗体蛋白支架中的抗原结合位点的使用综述于弗斯(Wess),2004(弗斯,L.在:生物世纪:关于生物业务的伯恩斯坦报告(BioCentury,The Bernstein Report on BioBusiness),12(42),A1-A7,2004)中。典型的为具有稳定骨架和一个或多个可变环的蛋白质,其中一个或多个环的氨基酸序列特定或随机地突变以便产生结合目标抗原的抗原结合位点。此类蛋白质包括来自金黄色葡萄球菌的蛋白A的IgG结合域、转铁蛋白、白蛋白、四连接素、纤连蛋白(例如第10个纤连蛋白III型域)、脂笼蛋白以及 γ -结晶和其他AffilinTM支架(Scil Proteins)。其他方法的实例包括基于大环寡肽(具有分子间二硫键的小蛋白)的合成的“微体”、微蛋白(VersabodiesTM,Amunix)和锚蛋白重复蛋白(DARPin,分子配偶体公司(Molecular Partners))。

[0309] 除抗体序列和/或抗原结合位点之外,结合剂还可以包括其他氨基酸,例如形成肽或多肽,如折叠域,或赋予分子除结合抗原能力之外的另一种功能特征。结合剂可以携带可检测标记,或可以缀合至毒素或靶向部分或酶(例如经由肽键或接头)。例如,结合剂可以包括催化位点(例如在酶域中)以及抗原结合位点,其中抗原结合位点结合至抗原并且因而将催化位点靶向抗原。催化位点可以例如通过裂解来抑制抗原的生物功能。

[0310] 从在此披露的说明书和实践的考虑中,其他实施例对本领域的普通技术人员来说将是显而易见的。本说明书和实例旨在被认为仅是示例性的,并且真正范围和精神由下面的权利要求书指示明。

[0311] 实例

[0312] 实例1.材料与方法

[0313] 临床样品

[0314] 遵循REMARK指南(23)对两个独立的乳腺癌样品组群进行分析。一个组群包含来自从1986-1998年提出的年龄<70岁的女性的诺丁汉Tenovus乳腺癌系列的1,795个连续病例(诺丁汉组群)(24,25)。可获得关于肿瘤类型、组织学分级、尺寸、淋巴结(LN)状态、ER状态、PR状态和HER2状态、细胞角蛋白(CK)特性、复发(局部、区域和远处)和存活的数据。第二组群由来自伦敦的盖伊与圣托马斯乳腺组织银行(Guy's and St.Thomas' Breast Tissue Bank)的1,197个侵袭性病例构成(伦敦组群)。患者从1960-1998年经历手术(98%从1975年起)。可获得关于肿瘤类型、分级、LN状态、ER状态、PR状态和HER2状态、无病存活和总体存活的数据。呈现出了临床病理数据汇总(图10)。所有研究都得到了伦敦东北部研究伦理委员会(North East London Research Ethics Committee)的批准。

[0315] 免疫组织化学分析

[0316] 免疫组织化学利用组织微阵列(TMA)的4 μ m的、福尔马林固定的、石蜡包埋的连续切片。每个样品都由最低两个x 0.6mm的肿瘤核心表示。应用标准抗生物素蛋白-生物素复合体技术(Vectastain Elite ABC试剂盒,载体实验室(Vector Laboratories),彼得伯勒,英国),与针对细胞角蛋白5/6(西格玛(Sigma),英国)和细胞角蛋白14(西格玛,英国)的柠檬酸盐缓冲液微波抗原修复。先前描述了用于 α v β 6整合素的方案(mAb 6.2G2,百健艾迪公司)(16)。正常乳腺(n=15)构成细胞角蛋白抗体的阳性对照,同时小鼠IgG表示阴性对照。将整合素 α v β 6染色作为肿瘤细胞染色程度(0,<25% = 1,25%-50% = 2,50%-75% = 3,>75% = 4)和强度(0 = 阴性,1 = 弱,2 = 中,3 = 强)的总和进行评分;从而给出0-7的最终得分范围。强 α v β 6染色的一个实例示于图1B中。每个肿瘤核心都通过两位独立的病理学家进行

评分;最终得分表示两个读数的平均值。显示出强烈表达(得分 ≥ 5)的病例与显示出中或阴性染色(得分<5)的那些之间的预定截断值用于所有分析中。对于CK5/6和CK14表达,如果出现>10%的染色,则病例被认为是阳性的(25)。

[0317] METABRIC组群预处理

[0318] 这项研究利用通过乳腺癌国际联盟的分子分类学(Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium)产生的METABRIC数据(26)。本项目的基金由英国癌症研究中心(Cancer Research UK)和不列颠哥伦比亚省癌症研究所分支(British Columbia Cancer Agency Branch)提供。将乳腺癌METABRIC数据集进行预处理,总结并且相对于由亿明达BeadStudio产生的原始表达文件进行分位数标准化。(R程序包:珠阵列v2.4.2和illuminaHuman v3.db_1.12.2)。从欧洲基因组-表型组档案(EGA)下载原始METABRIC文件(研究id:EGAS00000000083)。在我们进行分析时,一个METABRIC样品的原始数据文件不可用,因此将其排除。在R统计环境v2.14.1下进行所有预处理。

[0319] 存活分析

[0320] 使用 $\alpha v\beta 6$ 蛋白表达,把伦敦和诺丁汉临床组群中的HER2+患者分成低风险和高风险两组(低风险 $\alpha v\beta 6 < 5$,高风险 $\alpha v\beta 6 \geq 5$)。在R统计环境v.2.14.1下进行存活分析(R软件包:存活v2.36-14)。通过拟合单变量Cox比例风险模型估计风险比,并且使用对数秩检验计算风险组存活之间的差异显著性。同样地,使用ITGB6表达谱对METABRIC组群中的基因表达衍生的HER2+患者进行分析。通过使用由伦敦/诺丁汉组群的抗体研究确定的低风险和高风险HER2+患者的比例建立METABRIC中的ITGB6表达的风险组二分阈值。在R统计环境v2.14.1中画出卡普兰-迈耶存活曲线。

[0321] 细胞系与药物来源

[0322] 对二十个人乳腺癌细胞系的 $\alpha v\beta 6$ 表达进行分析。通过LGC STR概况分析(数据未显示)确认所有系的遗传一致性。使人乳腺癌细胞系MCF-7和MDA MB-468细胞在含有10%胎牛血清(FBS)和L-谷氨酰胺的DMEM中生长。MCF-7/neo-1和MCF-7/HER2-18是来自美国德克萨斯州的洪教授(Prof.Hung)的惠赠礼物(37)。细胞来源和培养基要求是如详述的(37,38,39,40)。使BT-474细胞在含有10%FCS、L-谷氨酰胺和胰岛素(10 μ g/ml)的RPMI中生长。

[0323] 小鼠单克隆抗体6.2G2是来自百健艾迪公司(剑桥,马萨诸塞州,美国)的慷慨礼物。IgG和 $\alpha v\beta 6$ 阻断性抗体264RAD是来自阿斯利康公司肿瘤学iMED(Oncology iMED,AstraZeneca)(麦克斯菲尔德,英国)的慷慨礼物。曲妥珠单抗是来自罗氏制药(Roche Pharmaceuticals)的惠赠礼物。siRNA由Dharmacon(SMARTpool: siGENOME,赛默飞世尔公司(Thermo Scientific))供应。生长因子由派普泰克(Peprotech)供应。

[0324] Transwell和微型器官型侵袭测定

[0325] 对于Transwell侵袭测定,处理后以 5×10^4 个细胞/孔接种到6.5mm直径的、8 μ m孔径的用70 μ l BD基质胶基底膜基质(基质胶):培养基(1:2比率)包被的Transwells®(康宁BV(Corning BV))中。72h之后使用CASY计数器(Scharfe Systems,德国)对通过基质胶被侵袭的细胞计数。对于器官型测定,处理后以 5×10^4 个细胞/孔接种到6.5mm直径的、4 μ m孔径的具有120 μ l胶原(鼠尾I型胶原,马拉松实验室(Marathon Laboratories)):基质胶混合物(70:30)(含有 5×10^4 MRC5/hTERT成纤维细胞)的Transwells上。每两天更换培养基持续5-6天,将凝胶在缩甲醛盐水中固定,用石蜡包埋并且将切片用苏木精和伊红染色。通过将在每

个凝胶上的5个点处的平均深度乘以侵袭性细胞所占的面积来计算侵袭指数。使用ImageJ 164软件进行分析。

[0326] 免疫印迹

[0327] 处理后将细胞在NP-40缓冲液中裂解并且然后使其经受蛋白质印迹。简言之,定量之后,每个泳道装载10–50 μ g的蛋白,跑胶并且将凝胶转移到膜上。通过在0.1%TBS-Tween-20中的5%脱脂乳中在室温下孵育1h来阻断非特异性结合。将膜用希望的一级抗体在4°C下孵育过夜。图13列出了抗体和供应商。使用ImageJ 1.64软件进行分析。

[0328] 人肿瘤异种移植物模型

[0329] 所有动物实验都得到了内政部的批准并且遵循内政部指南(Home Office Guidelines)。用于所有动物研究,将264RAD和曲妥珠单抗溶解于1xPBS中,最终浓度为10mg/kg。在注射肿瘤细胞前24h,将雌激素丸(0.25mg 60-天释放,美国创新研究所(Innovative Research of America))经皮下植入小鼠体内。用200 μ l的PBS中的1x 10⁶个MCF-7/HER2-18细胞或1:1PBS/基质胶中的1x 10⁷个BT-474细胞皮下接种SCID-小鼠(来自英国麦克尔斯菲尔德的阿斯利康公司肿瘤学iMED的慷慨礼物)或CD1nu/nu小鼠(查尔斯河实验室(Charles River Laboratories))。当肿瘤可触知(3–4mm³)或达到100或200mm³时,将小鼠随机分为处理组。小鼠每周接受两次腹膜内注射(10mg/kg,在200 μ l的PBS中)人IgG、264RAD、曲妥珠单抗或264RAD和曲妥珠单抗两者。用测径器在两个方向上每两周对肿瘤进行测量并且使用公式(宽度²×长度)/2计算肿瘤体积。

[0330] 统计学分析

[0331] 使用针对2个变量的学生t检验确定经药物处理培养物与对照体外培养物的统计显著性。对于3个或更多个变量,使用Prism GraphPad软件(Systat软件,圣何塞,加利福尼亚,美国),使用单因素ANOVA与邦弗朗尼(Bonferroni)的多重比较检验对数据进行分析。对于肿瘤异种移植物模型,标绘出单独的生长曲线并且然后将线性混合模型(27)用于检验处理之间的差异。在统计软件R(R开发核心团队(Development Core Team),2010)2.11.1中使用nlme软件包用最大似然性进行拟合。P值来自瓦尔德(Wald)检验。在Prism GraphPad中使用对数秩检验测量小鼠的存活。所有统计检验都是双侧的。

[0332] 实例2.合素 α V β 6和HER2的高共表达预测来自乳腺癌的存活不佳。

[0333] 我们在来自总计超过2000位患有乳腺癌的妇女的两个独立的组群(伦敦和诺丁汉)的组织微阵列(TMA)上针对 α V β 6表达进行了染色(示例性染色,图1A)分别将这两个组群的临床病理参数以及 α V β 6表达与这些参数的相关性示于图10和11中。正常乳腺组织(n>15)缺少 α V β 6表达,而在15%–16%的浸润性导管癌上观察到 α V β 6的高表达(图1A、1B和11)。 α V β 6的高表达与存活不佳之间存在着显著相关性(图1C和1D)。因此,伦敦组群的5年存活率从71.3%降至57%(图1C;P=2.9x 10⁻⁶)并且诺丁汉组群的5年存活率从73.5%降至53.2%(图1D;P=4.73x 10⁻⁵),并且存活不佳与 α V β 6的高表达之间的这种显著相关性延续至少15年(图6)。甚至在调整肿瘤分期、尺寸和分级之后, α V β 6仍是存活的独立预测物(P=0.03;合并的群组数据)。仅可获得诺丁汉系列的关于肿瘤播散的数据,其中 α V β 6表达与远处扩散显著相关(P=0.02)。在1026例 α V β 6阴性病例中,317例(31%)具有远处转移;而在相应的205例 α V β 6阳性病例中,81例(40%)具有远处转移。此外, α V β 6阳性癌症明显更可能扩散到骨(P=0.04)。

[0334] 针对两个组群,我们还注意到HER2与高 $\alpha V\beta 6$ 表达之间存在着强相关性($P=0.001$;图11)。 $\alpha V\beta 6$ 和HER2蛋白的高共表达在合并的伦敦和诺丁汉组群中显著降低存活率(图1E;风险比(HR)3.43; $P=3.98 \times 10^{-12}$)。增加的风险显现可在转录水平下得到控制,因为METABRIC乳腺癌表达数据库(>2000例病例(26))的分析证实,具有高ERBB2(HER2)和ITGB6(整合素 $\beta 6$ 亚基)基因表达的患者具有显著降低的存活率(图1F;HR=1.94, $P=0.003$)。因此,因为在蛋白质和mRNA两种水平下显现在HER2与 $\alpha V\beta 6$ 之间存在着预测来自乳腺癌的存活不佳的相关性,我们研究了这两种受体是否合作以促进侵袭和癌症。

[0335] 实例3.整合素 $\alpha V\beta 6$ 和HER2两者都促进乳腺癌侵袭。

[0336] 使用流式细胞术,我们针对 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的表达以及它们通过基质胶侵袭的能力对20个乳腺癌细胞系进行了筛选(图2A、2B和12)。我们发现80%的细胞系表达 $\alpha V\beta 6$ 并且在这些细胞系中,我们更仔细地检查了 $\alpha V\beta 6$ /HER2双阳性细胞系BT-474、MCF10A.CA1a(CA1a)以及抗曲妥珠单抗的MCF-7/HER2-18(HER2-18)。 $\alpha V\beta 6$ (264RAD)或HER2(曲妥珠单抗,TRA)的抗体阻断显著地阻断了侵袭(图2C和2D)。类似地,针对ITGB6(图2E)或ERBB2(图2F)的siRNA也显著阻断了侵袭。由于264RAD对 $\alpha V\beta 8$ 也具有一些活性,我们用 $\alpha V\beta 6$ 特异性抗体10D5重复了这些实验,得到了类似结果(图7A)。 $\alpha V\beta 6$ 和HER2的组合抗体阻断并没有将侵袭降低超过通过单一抗体阻断所实现的(图2G),可能表明这些受体通过相同途径发挥功能。在基质胶测定过程中或在7天处理之后,通过用264RAD、曲妥珠单抗或两种抗体的组合进行处理并未显著改变HER2-18或CA1a细胞的增殖(图7B)。在经3天经受任何处理的曲妥珠单抗敏感型BT-474细胞中增殖并未显著降低,尽管7天后曲妥珠单抗确实将增殖降低了约30%;264RAD不显著影响3天或7天后的BT-474增殖(数据未显示)。

[0337] 共聚焦显微术揭示, $\alpha V\beta 6$ 和HER2共定位在乳腺癌细胞中(图7C)。然而,这两种蛋白质在进行或不进行调蛋白 $\beta 1$ (HRG β)刺激的情况下没有共免疫沉淀,即使当添加蛋白质-蛋白质交联剂以加强任何弱的结合时(数据未显示)。

[0338] 实例4.整合素 $\alpha V\beta 6$ 介导HER2驱动的侵袭。

[0339] 为了确立 $\alpha V\beta 6$ 与HER2功能之间的关系,我们通过添加HRG β 诱导HER2/3异二聚化和下游信号传导活化来刺激HER2侵袭。HER3是HER2在乳腺癌中的优选二聚化配偶体(28)并且赋予不佳的存活。HRG β 还是HER4的配体,然而绝大多数的信号传导经由HER2/3进行(数据未显示)。这在肿瘤异种移植物中得到了证实,其中P-HER4表达在有或没有HRG β 的情况下是可忽略不计的(数据未显示)。

[0340] 图3A和3B显示,HRG β 显著增加HER2-18和CA1a两种细胞的侵袭倾向并且这种增加的侵袭可以通过HER2(曲妥珠单抗)或 $\alpha V\beta 6$ (264RAD)的抗体阻断来抑制。这些数据表明HER2促进的侵袭是由 $\alpha V\beta 6$ 介导的。相比之下,将HRG β 添加到BT-474细胞中没有增强侵袭能力,表明其HER2促进的侵袭倾向是最大的。然而, $\alpha V\beta 6$ 或HER2的阻断再次抑制了其内源性侵袭倾向(图3A和B)。

[0341] 为了在更生理相关的测定中测试侵袭,我们使用器官型侵袭测定测试了我们的细胞系,所述器官型侵袭测定允许肿瘤细胞侵入富含成纤维细胞的胶原凝胶中。我们发现,HER2-18和BT-474细胞无法适应该器官型系统,因此我们测试了CA 1a细胞。图3C显示,两种抗体阻断以及 $\beta 6$ 或HER2的siRNA敲低显著抑制侵袭。侵袭通过 $\alpha V\beta 6$ 阻断减少67.45%±12.53%并且通过HER2阻断减少69.81%±9.85%(侵袭被定量为直方图中所示的‘侵袭指

数'）。这些数据支持基质胶侵袭数据（图2）。总之，这些体外数据表明在乳腺癌中， $\alpha V\beta 6$ 与HER2合作以产生侵袭所需的细胞内信号，并且进一步表明 $\alpha V\beta 6$ 功能的阻断可以改进HER2靶向抗体疗法。注意，264RAD对 $\alpha V\beta 8$ 也具有一些活性（29），然而对MCF-/HER2-18、MCF10A没有。CA1a和BT-474不表达这种整合素，因此抗体的作用在这些细胞中特异性针对 $\alpha V\beta 6$ 。

[0342] 实例5. $\alpha V\beta 6$ 的抗体阻断改进曲妥珠单抗的体内功效

[0343] 为了测试 $\alpha V\beta 6$ 阻断是否可以改进曲妥珠单抗抗体疗法，我们测试了264RAD对曲妥珠单抗敏感型BT-474细胞系的体内生长的影响。图4A显示与IgG相比，用264RAD将具有 100mm^3 的BT-474肿瘤的小鼠处理2周使肿瘤生长停止（ $P<0.0001$ ），而曲妥珠单抗（TRA）将肿瘤生长显著减少了77.8%（ $P<0.0001$ ）。然而，264RAD和曲妥珠单抗的组合比单独的曲妥珠单抗更有效，其中在14天处理后与IgG相比体积减小94.8%（ $P<0.0001$ ）。

[0344] 为了评估 $\alpha V\beta 6$ 阻断是否可以改进曲妥珠单抗在抗曲妥珠单抗肿瘤中的功效，我们用抗曲妥珠单抗MCF-7/HER2-18（HER2-18）细胞系在体内重复了抗体疗法。在疗法开始之前允许肿瘤达到 100mm^3 。图4B显示，与进展快速的IgG对照相比，用264RAD或曲妥珠单抗进行的单一疗法以相似的程度减缓生长（与IgG相比，最终体积分别减小53.9%（ $P=0.0006$ ）和52.1%（ $P=0.0004$ ））。组合疗法将肿瘤体积减小至显著大于任一单独抗体情况下的程度，其中与单独的曲妥珠单抗相比肿瘤体积进一步减小24.14%（ $P<0.0001$ ）并且与IgG相比肿瘤体积总体减小76.2%（ $P<0.0001$ ）。用抗体处理后的BT-474和HER2-18异种移植物的代表性图像示于图4C中。

[0345] 接下来，我们通过分析处理后异种移植物中的蛋白质表达研究了这种抗肿瘤发生效果背后的分子机制。

[0346] 实例6.乳腺肿瘤对264RAD和曲妥珠单抗疗法的分子应答。

[0347] 将来自处理后2周的BT-474和HER2-18异种移植物的残余肿瘤组织裂解并且针对来自2周治疗方案的多种信号传导分子进行分析。评估了每种抗体的直接靶标 $\alpha V\beta 6$ 、HER2和HER3的蛋白质表达，以及这些途径（总（T）-Akt2）和 $\alpha V\beta 6$ 相关TGF β 信号传导途径（总（T）和磷酸（P）-Smad2）的下游靶标的蛋白质表达。图4D中的免疫印迹（定量在图4E中）显示用264RAD或曲妥珠单抗（TRA）处理3种代表性BT-474异种移植物显著减少 $\beta 6$ 的表达；组合疗法几乎消除了 $\beta 6$ 表达。组合疗法还增强了在单独的曲妥珠单抗的情况下观察到的HER2、HER3、T-Smad2、Psmad2和T-Akt2表达的减少，与用组合治疗时观察到的增强的抗致瘤性一致。

[0348] 使HER2-18异种移植物经受相同分析（图4F和G）。再一次， $\beta 6$ 水平被 $\alpha V\beta 6$ 阻断性抗体264RAD以及被组合治疗显著降低。仅在组合疗法之后观察到P-HER2、T-HER3、P-HER3、T-Smad2和T-Akt2的统计学上显著的减少。T-HER2水平在用曲妥珠单抗处理的HER2-18肿瘤中是增加的，如先前已经观察到的。我们观察到用264RAD阻断 $\alpha V\beta 6$ 也增加HER2表达。然而，组合抗体疗法显著抑制了经由HER2的信号传导，正如通过减少的P-HER2水平所观察到的。

[0349] 实例7. $\alpha V\beta 6$ 的抗体阻断在抗曲妥珠单抗模型中改进曲妥珠单抗功效并且延长存活。

[0350] 曲妥珠单抗抗性引起显著的临床问题，因此我们进一步在HER2-18抗曲妥珠单抗模型中研究了组合疗法的增强的抗致瘤性。在初始实验中，评估了方案对小肿瘤的效果。在开始为期6周的抗体疗法之前，允许皮下异种移植物达到可触知的尺寸（ $10-20\text{mm}^3$ ）。与IgG相比，264RAD将生长减少超过70%，相当于用曲妥珠单抗时所观察到的减少（两者均为 $P<$

0.001) (图5A)。更令人印象深刻的, $\alpha V\beta 6$ 和 HER2 的组合阻断在所有处理的小鼠中消除了 HER2-18 肿瘤。

[0351] 我们接下来确定组合疗法对较大的异种移植物是否有效。在疗法开始之前允许肿瘤达到 200mm^3 。图5B显示,与进展快速的IgG对照相比,用264RAD或曲妥珠单抗进行的单一疗法再次以相似的程度减缓生长(对应地 $P=0.0019$ 和 $P=0.0022$),生长再次通过组合疗法显著降低(对应地 $P=0.0135$ 和 $P=0.0223$)。组合疗法完全抑制了肿瘤生长($P<0.0001$,与IgG相比),其尺寸保持50天不变。允许这些小鼠生长,直到其肿瘤达到最大可容许尺寸(根据内政部规定),此时将它们杀死。图5C显示,与IgG相比,用264RAD或曲妥珠单抗进行的单一疗法显著增加存活(对应地 $P=0.0007$ 和 $P=0.018$),组合疗法甚至更有效($P<0.0001$)。事实上,组合疗法显著比单一疗法更好(与264RAD和曲妥珠单抗相比,对应地 $P=0.0039$ 和 $P=0.0393$)。因此, $\alpha V\beta 6$ 的264RAD阻断在曲妥珠单抗敏感型和抗曲妥珠单抗乳腺癌两种异种移植植物中都抑制乳腺癌生长并且增强曲妥珠单抗的治疗能力。

[0352] 实例8. 乳腺肿瘤对长期264RAD和曲妥珠单抗疗法的分子应答。

[0353] 为了证实单一疗法是否经由与组合疗法类似的分子机制运行,我们在6周处理后收获并裂解了肿瘤组织(来自图5A),并且针对相同组的蛋白质进行免疫印迹。因为在此项研究的早期组合处理的异种移植物被消除,无法进行组合疗法的分析。图5D和E显示,经6周的264RAD和曲妥珠单抗单一疗法显著减少 $\beta 6$ 蛋白、T-HER2、P-HER2、T-HER3、P-HER3和T-Akt2的表达,类似于持续2周的组合疗法的应答(图4D-G)。

[0354] 在用264RAD或曲妥珠单抗进行的2周单一疗法后,在(曲妥珠单抗敏感型)BT-474细胞中发生了TGF β 信号传导的抑制(如通过T-Smad2和P-Smad2的减少测量的),并且这种减少被组合疗法进一步减少(图4D)。相比之下,在2周抗体疗法之后,HER2-18的T-Smad2或P-Smad2变化有限或没有变化。然而,6周后,在HER2-18肿瘤中单一疗法T-Smad2和PSmad2水平显著降低(图5D和E)。

[0355] 支持这些数据,HER2-18异种移植物中 $\beta 6$ 表达的免疫组织化学分析(图5F)也显示与 $\beta 6$ 表达几乎被消除的2周组合疗法相比,6周后 $\beta 6$ 表达通过单一疗法减少。

[0356] 此外,这得到了在HER2-18、CA1a和BT-474细胞中进行的基质胶侵袭测定的支持,其中用TGF(3RII的siRNA或TGF β 的抗体(抗体数据未显示为相似的结果)处理的细胞不能减少侵袭,而264RAD在存在和不存在TGF β 的情况下能够以类似程度抑制侵袭(图8)。

[0357] 实例9. 讨论

[0358] 此项研究结论性地显示1)整合素 $\alpha V\beta 6$ 在乳腺癌中的上调是预测患者的与远处转移的发展相关的预后不良的预后因子($P=0.03$);2) $\alpha V\beta 6$ 和HER2的共上调鉴定了迄今鉴定的最差预后乳腺癌亚组之一;以及3)这些临床观察结果的生物解释是 $\alpha V\beta 6$ 和HER2合作,即整合素 $\alpha V\beta 6$ 介导HER2促进的癌症的侵袭行为。因此,我们的数据支持以下建议,即针对 $\alpha V\beta 6$ 表达测试活组织检查应该成为常规免疫病理程序,以将患有乳腺癌的妇女分进新的‘非常高’风险 $\alpha V\beta 6$ 阳性/HER2+亚组层中。这种分层的价值是我们的研究还为这个非常高风险亚组提出了有前景的治疗策略。

[0359] 由于其在1988年的引入,抗-HER2抗体曲妥珠单抗已经成为患有HER2+乳腺癌的女性的一线疗法,作为早期乳腺癌的辅助疗法或与转移性乳腺癌的化疗组合(5,30)。因此,在2012年,当在美国超过225,000位妇女患上乳腺癌时,20%–25%已经具有HER2过表达(NIH

统计资料)并且可能已经接受曲妥珠单抗疗法。然而,70%的这些妇女将对曲妥珠单抗产生抗性或对其具有预先存在的抗性(7),这意味着多达39,375位美国妇女将发展不存在特异性疗法的HER2+乳腺癌。我们的数据显示,超过40%的这些患有抗曲妥珠单抗疾病的妇女也可能表达高水平的 $\alpha v\beta 6$ 。我们建议在这些妇女中 $\alpha v\beta 6$ 的抗体靶向可以提供治疗选择并且我们的临床前研究支持此建议。我们的数据显示,在曲妥珠单抗敏感型和抗曲妥珠单抗的过表达HER2的人类乳腺癌异种移植植物两者中, $\alpha v\beta 6$ (用264RAD)和HER2(用曲妥珠单抗)的同时抗体靶向显著改进单独的曲妥珠单抗的治疗效果并且显著增加存活时间。迫切需要在临幊上实现此类应答。

[0360] 抗体阻断如何可以抑制或甚至减少乳腺癌生长的分子机制部分地涉及肿瘤表型向较低风险亚型的转变。因此,在经抗体处理的肿瘤中,存在 $\alpha v\beta 6$ 、HER2和HER3的表达的一致下调,这三种受体的上调促进乳腺癌、降低存活率并且因此驱动转移。甚至靶向 $\alpha v\beta 6$ 或HER2的单一疗法能够抑制 $\alpha v\beta 6$ 表达,进一步显示这两种分子在乳腺癌中被共调节。在曲妥珠单抗敏感型系BT-474中通过两周的单一抗体疗法实现了HER2的下调,但是在抗曲妥珠单抗系HER2-18中没有。然而,6周单一疗法消除了 $\alpha v\beta 6$ 、HER2和HER3在HER2-18抗曲妥珠单抗肿瘤中的表达。

[0361] 在 $\alpha v\beta 6$ 或HER2的抗体靶向之后,BT-474或HER2-18肿瘤模型中的 $\alpha v\beta 6$ 和/或HER2损失显著减缓肿瘤生长,但是并不以组合的 $\alpha v\beta 6$ /HER2靶向那样的相同方式使肿瘤生长停止或减少。因此,我们着眼于牵涉在 $\alpha v\beta 6$ 和HER2行为中的信号传导途径。

[0362] 研究已经显示,曲妥珠单抗在HER2+细胞中通过促进HER2降解(31)和PI3-K/Akt信号传导下调(32)来介导抗增殖作用,数据与在体内观察到的那些(不仅是在HER2的曲妥珠单抗阻断的情况下观察到的,并且还有在使用264RAD的 $\alpha V\beta 6$ 阻断的情况下观察到的)一致。我们确定我们的细胞系表达Akt1和Akt2,但不表达Akt3(数据未显示)。此外,在体外,Akt2而非Akt1的siRNA下调抑制BT-474、HER2-18和CA1a细胞系的侵袭(图9)。因此,我们针对Akt2蛋白对我们的经抗体处理的肿瘤进行了分析并且显示为期2周的组合疗法显著减少Akt2表达,而单一疗法几乎没有作用。因此,与单一疗法相比,Akt2(在3/3的乳腺癌细胞系中侵袭所必需的Akt同工型)的损失与组合的 $\alpha v\beta 6$ 和HER2靶向的改进的体内功效相关。

[0363] 我们还检查了TGF β 信号传导,因为 $\alpha v\beta 6$ 可以活化潜伏的TGF β (16)。此外,活化的TGF β 通过增加迁移、侵袭和转移而促进HER2致瘤性(10,11,12,33)。再一次,仅组合疗法在BT-474肿瘤中显著减少总(T)和活化的(P)-Smad2,而单一疗法并不显著有效。相比之下,在抗曲妥珠单抗肿瘤中,TGF β 信号传导的减少中等,或者仅在组合疗法之后观察到T-Smad2的边缘显著减少。因此,在2周抗体疗法之后,与TGF β 信号传导的下调相比,Akt2的下调与伴随组合疗法所见的增强的肿瘤抑制更强烈相关。然而这并不能否定以下可能性,即归因于 $\alpha v\beta 6$ 抗体阻断的TGF β 信号传导损失有助于肿瘤治疗和在6周治疗之后所见的总体存活。

[0364] 总之,我们建议针对 $\alpha v\beta 6$ 表达检查乳腺癌应该成为标准实践,因为 $\alpha v\beta 6$ 的高表达识别患有显著更危险类型的疾病的妇女。这尤其适用于40%的患有HER2/ $\alpha v\beta 6$ 双阳性癌症的妇女,她们代表迄今鉴定的最差预后乳腺癌组之一。乳腺癌的 $\alpha v\beta 6$ 表达的常规确定将妇女分进需要治疗性干预的更高风险类别层中。此外,我们的数据还显示, $\alpha v\beta 6$ 的抗体阻断可以为此类妇女提供有效的额外疗法,甚至对于患有抗曲妥珠单抗疾病的那些妇女也是可能的。人类(264RAD(29))和人源化(STX-100(36)) $\alpha v\beta 6$ 阻断性抗体正在被开发供人类使用的

事实显示乳腺癌的 α V β 6靶向疗法是可行的并且应该成为不远的将来的主要考虑事项。

[0365] 实例10. α V β 6结合剂:免疫与滴度测定

[0366] 免疫

[0367] 分别使用可溶性 α V β 6和细胞结合的 α V β 6(在细胞表面表达人 α V β 6的CHO转染子)进行免疫。对于CHO转染子的产生,将人全长 α V β 6cDNA插入pcDNA 3表达载体中。经由电穿孔对CHO细胞进行瞬时转染。通过荧光活化细胞分选仪(FACS)分析确认人 α V β 6在细胞表面上在适于免疫原目的的水平下的表达。根据披露于提交在1996年12月3日的美国专利申请序列号08/759,620以及公开于1998年6月11日的国际专利申请号WO 98/24893和公开于2000年12月21日的WO 00/76310(将其披露通过引用而特此结合)中的方法将对于每个小鼠而言十 μ g可溶性蛋白(针对活动1)和对于每个小鼠而言 3×10^6 个细胞的经转染的CHO细胞(针对活动2)用于在XenoMouseTM体内进行初次免疫。初次免疫之后,向一组和二组给予十三次后续加强免疫(五 μ g/小鼠)(可溶性抗原)并且向三组和四组给予九次后续加强免疫(1.5×10^6 个细胞/小鼠)(细胞结合的抗原)。免疫程序总结于表2中。

[0368] 表2:免疫程序总结

	活动	组	免疫原	品系	小鼠数量	免疫途径
[0369]	1	1	可溶性 α V β 6	XMG2/k	10	IP, 尾部, BIP, 两次/周, x6 周

	活动	组	免疫原	品系	小鼠数量	免疫途径
[0370]	1	2	可溶性 α V β 6	XMG1/kl	10	IP, 尾部, BIP, 两次/周, x6 周
	2	3	细胞结合的 α V β 6 (CHO 转染 子)	XMG2/k	10	IP, 尾部, BIP, 两次/周, x6 周
	2	4	细胞结合的 α V β 6 (CHO 转染 子)	XMG1/kl	10	IP, 尾部, BIP, 两次/周, x6 周

[0371] 通过滴度选择动物用于收获

[0372] 通过ELISA测定测试用可溶性抗原免疫的小鼠的针对人 α V β 6的抗体的滴度。通过FACS测试用天然(细胞结合的)抗原免疫的小鼠的抗体滴度。ELISA和FACS分析显示存在一些显现对 α V β 6具有特异性的鼠。因此,在免疫程序结束时,选择二十只小鼠用于收获,并且将淋巴细胞从免疫小鼠的脾和淋巴结中分离出来,如下一实例中所描述的。

[0373] 实例11.淋巴细胞回收与B细胞分离

[0374] 通过颈脱位法处死免疫小鼠，并且收获引流淋巴结并且将来自每个组群的进行合并。将淋巴细胞通过在DMEM中研磨而解离以从组织中释放细胞，并且将细胞悬浮于DMEM中。通过在IgM上进行阴性选择并且在IgG上进行阳性选择来富集B细胞。培养这些细胞以允许B细胞扩增并分化成抗体分泌型浆细胞。

[0375] 使抗体分泌型浆细胞常规地在选择培养基中生长。使收集自潜在地产生抗-人 $\alpha V\beta 6$ 抗体的细胞的耗尽的上清液经受后续筛选测定，如在以下实例中详述的。

[0376] 实例12. 与细胞结合的 $\alpha V\beta 6$ 的结合

[0377] 评估分泌抗体与 $\alpha V\beta 6$ 的结合。使用FMAT宏共焦扫描仪 (macroconfocal scanner) 评估与细胞结合的 $\alpha V\beta 6$ 的结合，并且通过ELISA分析与可溶性 $\alpha V\beta 6$ 的结合，如下文描述的。

[0378] 对收集自收获细胞的上清液进行测试，以评估分泌抗体与稳定地过表达 $\alpha V\beta 6$ 的HEK 293细胞的结合。亲本293F细胞系用作阴性对照。将Freestyle培养基(英杰公司(Invitrogen))中的细胞以2500个细胞/孔的密度(针对稳定转染子)和以22,500个细胞/孔的密度(针对亲本细胞)接种到384孔FMAT板(每孔的体积为50 μ L)中，并且将细胞在37°C下孵育过夜。然后，添加10 μ L/孔的上清液，并且将板在4°C下孵育大约一小时，这之后以2.8 μ g/ml的浓度添加10 μ L/孔的抗-人IgG-Cy5二级抗体(400ng/ml终浓度)。然后将板在4°C下孵育一小时，并且使用FMAT宏共焦扫描仪(应用生物系统公司(Applied Biosystems))读取荧光。11种抗体的FMAT结果总结在表3中。

[0379] 另外，通过ELISA分析与可溶性 $\alpha V\beta 6$ 结合的抗体。通过在TBS/1mM MgCl₂缓冲液中在4°C下用浓度为5 μ g/ml的 $\alpha V\beta 6$ 孵育过夜(每孔的总体积为50 μ L)包被Costar培养基结合型96孔板(Costar目录号3368)。然后将板用TBS/1mM MgCl₂缓冲液洗涤，并且在室温下用250 μ L的1X PBS/1%乳封闭三十分钟。然后将十 μ L的上清液添加至40 μ L TBS/1mM MgCl₂/1%乳中并在室温下孵育一小时。将板洗涤并且然后在TBS/1mM MgCl₂/1%乳中与0.400ng/ml的山羊-抗-人IgG Fc-过氧化物酶一起孵育，并且在室温下孵育一小时。将板洗涤并且然后用1-Step TMB底物使其显色。抗体之一的ELISA结果示于表3中。

[0380] 表3：上清液与细胞结合的 $\alpha V\beta 6$ 和可溶性 $\alpha V\beta 6$ 的结合

[0381]

mAb	FMAT 数据			ELISA 数据
	计数	FL1	FL1X 计数	
sc 049	185	4377.73	809880	ND

[0382]

mAb	FMAT 数据			ELISA 数据
	计数	FL1	FL1X 计数	
sc 058	ND	ND	ND	1.79
sc 188	127	628.04	79761	ND
sc 097	98	1237.18	121243	ND
sc 277	28	382.31	10704	ND
sc 133	82	709.82	58205	ND
sc 161	23	725.21	16679	ND
sc 254	174	9179.65	1597259	ND
sc 264	63	734.29	46260	ND
sc 298	102	2137.94	218069	ND
sc 374	174	4549.65	791639	ND
sc 320	141	3014.63	425062	ND
阴性对照(空白)：	0	0	0	0.21
阳性对照(2077z-1 ug/mL)：	67	659.49	44185	6.00

[0383] 实例13.细胞粘附的抑制

[0384] 为了确定包含不同抗体的上清液的相对效力,评估抗体抑制TGF β LAP介导的 α V β 6阳性HT29细胞粘附的能力。在测定之前,将板用10 μ g/ml TGF β LAP包被过夜,并且用3%BSA/PBS预先封闭1小时。然后将细胞沉淀并且在HBBS中洗涤两次,这之后然后将细胞以适当浓度重悬于HBSS中。将细胞在V底板中在适当抗体的存在下在4℃下孵育30分钟。除去抗原包被溶液并且将板在室温下用100 μ L的3%BSA封闭一小时。将板用PBS或HBSS洗涤两次,并且将细胞-抗体混合物转移到包被板中并且将板在37℃下孵育30分钟。然后将包被板上的细胞在温HBSS中洗涤四次,并且之后将细胞在-80℃下冷冻一小时。允许细胞在室温下解冻一小时,并且然后根据制造商的说明书将100 μ L的CyQuant染料/裂解缓冲液(分子探针公司(Molecular Probes))添加至每个孔中。在485nm的激发波长和530nm的发射波长下读取荧光。十二种抗体的结果总结于表4中。相对于板上的包被的和未包被的对照孔而言,那些抗体所显示的效力范围是从62%抑制至超过100%抑制,这些对照孔用以表示可以在该测定中获得的最大和最小粘附值。

[0385] 表4:粘附测定

抗体 ID	测定 1%抑制	测定 2%抑制	平均% 抑制
[0386]	sc 049	80%	98%
	sc 058	77%	46%
	sc 097	96%	106%
	sc 133	99%	106%
	sc 161	98%	106%
	sc 188	99%	103%
	sc 254	98%	106%
	sc 264	98%	100%
	sc 277	98%	101%
	sc 298	98%	102%
	sc 320	97%	97%
	sc 374	118%	89%
			104%

[0387] 实例14. 与猕猴(Macaque) $\alpha V\beta 6$ 和人 αV 的交叉反应性

[0388] 在用食蟹猴(cynomolgus) αV 和食蟹猴 $\beta 6$ 瞬时转染的HEK-293细胞上, 使用FACS分析对上清液测试包含抗体的上清液与猕猴 $\alpha V\beta 6$ 的交叉反应性。

[0389] 还测试了与人 αV 的交叉反应性。针对该测定, 在表达 $\alpha V\beta 3$ 和 $\alpha V\beta 5$ 但不表达 $\alpha V\beta 6$ 的亲本A375M细胞上, 使用FACS分析对上清液测试交叉反应性。设计此次筛选, 以显示抗体特异地地识别 $\beta 6$ 链或与 αV 结合的 $\beta 6$ 链。在与猕猴 $\alpha V\beta 6$ 交叉反应性筛选相同的时间进行人 αV 测定。

[0390] 如下进行测定。通过以下方式将汇合率为大约75%的A375M细胞用CFSE细胞内染料进行标记: 在falcon管中解离并且然后沉淀细胞(相当于250,000至300,000个细胞/孔), 然后重悬于FACS缓冲液中的0.125 μM CFSE中至对每250,000个细胞而言的终体积为100 μL , 并且然后在37°C下孵育五分钟。然后将细胞沉淀, 弃去上清液并且重悬于FACS缓冲液中并且在37°C下孵育30分钟。然后将细胞用FACS缓冲液洗涤两次并且重悬于100 μL FACS缓冲液/孔的终体积中。

[0391] 将HEK-293细胞用食蟹猴 αV 和食蟹猴 $\beta 6$ 瞬时转染。48小时之后, 收集细胞并且将其重悬于FACS缓冲液中, 以达到100 μL 中大约50,000个细胞的终浓度。

[0392] 将总计大约100,000个细胞(包含CFSE标记的A375M细胞和转染的293细胞的50:50混合物)如下用于每个反应中。将100 μL 的CFSE标记的A375M细胞和100 μL 的293细胞分配进V底板中。将板中的细胞以1500rpm沉淀3分钟, 并且然后重悬于100 μL FACS缓冲液中。重复沉淀步骤, 并且除去FACS缓冲液上清液。添加50 μL 体积的包含收获的抗体的上清液或对照一级抗体并且将细胞重悬。一级抗体对照是鼠类 $\alpha V\beta 6$ (Cat#MAB2077z, Chemicon) 和抗- αV 重组体。将板在冰上孵育45分钟, 这之后添加100 μL FACS缓冲液以稀释一级抗体。然后通过在1500rpm下离心3分钟沉淀细胞, 并且将沉淀物重悬于100 μL FACS缓冲液中。重复沉淀步骤, 并且除去FACS缓冲液上清液。然后将细胞重悬于适当的二级抗体(5 $\mu g/ml$)和7AAD染料(10 $\mu g/ml$)中, 并且在冰上染色7分钟。然后添加150 μL 的FACS缓冲液并且将细胞以1500rpm沉淀3分钟, 这之后将细胞在100 μL FACS缓冲液中洗涤, 沉淀, 并且然后重悬于250 μL 缓冲液中并

且添加至FACS管中。将样品在高通量FACS机上进行分析并且使用Cell Quest Pro软件进行分析。

[0393] 十二种抗体的结果总结在表5中，并且证明在亲本A375M细胞上，所示的抗体能够特异性地结合至猕猴 α V β 6，但不能非特异性地结合人 α V。

[0394] 表5.与猕猴 α V β 6和人 α V的交叉反应性

[0395]	抗体 ID	Mac AVB6 转变的细 胞%	Mac AVB6 几何平均 值	A375M 转变的细 胞%	A375M 几 何平均值
[0396]	sc 049	23%	30.19	20%	1.74
	sc 058	25%	22.77	18%	1.78
	sc 097	35%	37.04	24%	1.84
	sc 133	32%	35.22	24%	1.79
	sc 161	14%	32.98	11%	16.68
	sc 188	18%	23.9	13%	1.65
	sc 254	59%	78.49	55%	2.31
	sc 264	55%	66.38	46%	2.35
	sc 277	35%	33.35	23%	1.86
	sc 298	53%	63.08	45%	2.14
	sc 320	19%	33.45	15%	23.18
	sc 374	51%	61.79	39%	2.14
	人 IgG 同 种型对照	1% (第 1 天) 0% (第 2 天)	9.54 (第 1 天) 7.39 (第 2 天)	5% (第 1 天) 1% (第 2 天)	1.66 (第 1 天) 7.23 (第 2 天)
	具有鼠类 二级抗体 的小鼠 IgG2	1% (第 1 天) 0% (第 2 天)	8.85 (第 1 天) 11.21 (第 2 天)	4% (第 1 天) 3% (第 2 天)	1.67 (第 1 天) 11.16 (第 2 天)
	阳性对照 2077z (1 ug/ml)	42% (第 1 天) 11% (第 2 天)	55.52 (第 1 天) 28.11 (第 2 天)	30% (第 1 天) 5% (第 2 天)	2.03 (第 1 天) 15.36 (第 2 天)

[0397] 实例15. α V β 6特异性溶血空斑测定

[0398] 从每次收获选择抗体分泌型浆细胞用于产生重组抗体。这里，使用荧光空斑测定来鉴定表达针对 α V β 6的抗体的单一浆细胞。然后，使单一细胞进行逆转录和聚合酶链式反

应,以挽救和扩增编码初始抗体特异性的可变重链和可变轻链,如在下一实例中描述的。下文描述了进行 $\alpha V\beta 6$ 特异性溶血空斑测定所需的多种专门试剂和材料的制备。

[0399] 绵羊红细胞(SRBC)的生物素酰化。将SRBC作为25%储备液储存在RPMI培养基中。通过将1.0mL的储备液等分到15-mL falcon管中,旋降细胞并且除去上清液而获得250 μ l SRBC压实的细胞沉淀。然后将细胞沉淀重悬于50mL管中的4.75mL PBS (pH 8.6) 中。在分开的50mL管中,将2.5mg的碘基-NHS生物素添加至45mL的PBS (pH 8.6) 中。一旦生物素已经完全溶解,便添加5mL的SRBC并且将该管在室温下旋转1小时。将SRBC在3000g下离心5分钟。将上清液抽出并且添加25mL PBS (pH 7.4) 作为洗涤液。将洗涤循环重复3次,然后将4.75mL免疫细胞培养基(具有10%FCS的RPMI 1640)添加至250 μ l生物素酰化的SRBC(B-SRBC)沉淀中,以轻轻地重悬B-SRBC(5% B-SRBC储备液)。将储备液储存在4°C下直到需要。

[0400] B-SRBC的链霉亲和素(SA)包被。将一mL的5% B-SRBC储备液转移到干净的埃彭道夫(eppendorf)管中。通过在微量离心管中以8000rpm(6800rcf)脉冲自旋使B-SRBC细胞沉淀。然后将上清液抽出,将沉淀重悬于1.0mL PBS (pH 7.4) 中,并且重复离心。将洗涤循环重复2次,然后将B-SRBC沉淀重悬于1.0mL的PBS (pH 7.4) 中,以给出5% (v/v) 的终浓度。添加10 μ l的10mg/mL链霉亲和素(CalBiochem,圣地亚哥,加利福尼亚州)储备溶液。将管混合并且在室温下旋转20分钟。重复洗涤步骤并且将SA-SRBC重悬于1mL PBS (pH 7.4) (5% (v/v)) 中。

[0401] SA-SRBC的人 $\alpha V\beta 6$ 包被。将可溶性抗原(缺少跨膜域)用于包被SRBC。使用两条链,因为 $\alpha V\beta 6$ 仅作为二聚体而呈现在细胞表面。将SA-SRBC用生物素酰化的 $\alpha V\beta 6$ (50 μ g/mL)包被,混合并且在室温下旋转20分钟。将SRBC用1.0mL的PBS (pH 7.4) 如上洗涤两次。将Ag包被的SRBC重悬于RPMI(+10%FCS)中至终浓度为5% (v/v)。

[0402] 通过免疫荧光(IF)确定 $\alpha V\beta 6$ -SRBC的量。将10 μ l的5% SA-SRBC和10 μ l的5% Ag包被的SRBC各自添加至包含40 μ l的PBS的分开的干净的1.5mL埃彭道夫管中。将人抗- $\alpha V\beta 6$ 抗体以50 μ g/mL添加至SRBC的每个样品中。将管在室温下旋转25分钟,并且然后将细胞用100 μ l的PBS洗涤三次。将细胞重悬于50 μ l的PBS中,并且与缀合到光稳定的荧光染料Alexa488(分子探针公司,尤金,俄勒冈)上的2 μ g/mL Gt-抗人IgG Fc抗体一起孵育。将管在室温下旋转25min,随后用100 μ l PBS洗涤并且重悬于10 μ l PBS中。使10 μ l的染色细胞在干净的玻璃显微镜载玻片上印迹,用盖玻片覆盖,在荧光下观察,并且在0-4的任意标尺上评分以评估分离细胞的量。

[0403] 浆细胞的制备。收获单一B细胞培养物孔的内容物,其先前被鉴定为中和 $\alpha V\beta 6$ 活性(因此包含分泌感兴趣的免疫球蛋白的B细胞克隆)。通过添加RPMI+10%FCS在37°C下回收存在于孔中的B细胞培养物。将细胞通过用移液管吸移来重悬并且然后转移到干净的1.5mL 埃彭道夫管中(终体积大约500-700 μ l)。将细胞在微量离心管中以1500rpm(240rcf)在室温下离心2分钟,然后将管旋转180度并且再次以1500rpm离心2分钟。将冷冻培养基抽出并且将免疫细胞重悬于100 μ l RPMI(10%FCS)中,然后离心。用RPMI(10%FCS)重复该洗涤并且将细胞重悬于60 μ l RPMI(FCS)中并且储存在冰上直至准备使用。

[0404] 溶血空斑测定的进行。向60 μ l的免疫细胞样品中添加60 μ l的 $\alpha V\beta 6$ 包被的SRBC(5% v/v储备液)、在RPMI(FCS)中制备的4x豚鼠补体(西格玛,奥克维尔,安大略省)储备液和4x增强型血清储备液(1:900,在RPMI(FCS)中)中的每者。将来自100mm Falcon组织培养板的

混合物(3-5 μ l)在塑料盖上点样并且将斑点用未稀释的石蜡油覆盖。将载玻片在37℃下孵育最低45分钟。

[0405] 空斑测定结果的分析。用人 α V β 6的催化域成功地包被了绵羊红细胞。这些Ag包被的红细胞然后被用来从示于下表6中的孔中鉴定抗原特异性浆细胞。然后将这些细胞通过显微操作分离。在进行显微操作以挽救抗原特异性浆细胞之后,通过RT-PCR在单一浆细胞上挽救编码可变区的基因,如在下一实例中进一步描述的。

[0406] 表6.空斑测定结果

亲本板 ID	行	列	空斑测定	
			测定	单一细胞
68	B	10	荧光	45-57
296	D	10	荧光	58-59
318	F	1	溶血	60-62
612	G	1	荧光	187-189
752	D	12	荧光	95-100
762	D	8	荧光	277-286
766	B	5	荧光	132-143, 147-150
827	E	12	荧光	159-170
659	F	11	荧光	252-263
761	H	3	荧光	264-276
765	A	8	荧光	287-298
652	D	2	荧光	374-379, 392-397
806	A	6	荧光	312-321

[0407] [0408] 实例16.重组蛋白分离

[0409] 分离希望的单一浆细胞之后,提取mRNA,并且进行逆转录酶PCR以产生编码由每个细胞分泌的抗体的可变重链和轻链的cDNA。将人可变重链cDNA用PCR过程中添加的限制性内切酶消化并且将此反应的产物克隆到具有用于克隆的相容突出端的IgG2表达载体中。通过将人IgG2的恒定域克隆到pcDNA3.1+/Hygro(英杰公司,伯灵顿,安大略省,加拿大)的多克隆位点中来产生此载体。将人可变轻链cDNA用PCR过程中添加的限制性内切酶消化并且将此反应的产物克隆到具有用于克隆的相容突出端的Ig κ 或Ig λ 表达载体中。通过将人IgK或IgL的恒定域克隆到pcDNA3.1+/Neo(英杰公司)的多克隆位点中来产生此载体。

[0410] 然后使用lipofectamine将重链和轻链表达载体共转染进汇合率为70%的人胚肾(HEK)293细胞的60mm培养皿中。被转染的细胞分泌具有与原始浆细胞相同的特异性的重组抗体,持续24至72小时。从HEK 293细胞中收获上清液(3mL)并且通过特异性检测人IgG的夹心ELISA来证明完整抗体的分泌。使用ELISA通过重组抗体与 α V β 6的结合确认特异性。分泌可以与靶抗原结合的抗体的被挽救克隆总结在表7中。

[0411] 表7.重组抗体的分泌和结合数据

亲本板 ID				
	板	行	列	抗体 ID
[0412]	68	B	10	49
	296	D	10	58
	612	G	1	188
	752	D	12	97
	762	D	8	277
	766	B	5	133
	827	E	12	161
	659	F	11	254
	761	H	3	264
	765	A	8	298
	652	D	2	374
	806	A	6	320

[0413] 实例17. 重组抗体的纯化

[0414] 对于较大规模地生产抗- α V β 6抗体, 将重链和轻链表达载体(2.5 μ g的每条链/培养皿)脂转染到十个汇合率为70%的HEK 293细胞的100mm培养皿中。将转染细胞在37℃下孵育4天, 收获上清液(6mL)并且更换为6mL的新鲜培养基。在第7天, 除去上清液并且与初始收获物合并(来自10个板, 总计120mL)使用蛋白-A琼脂糖凝胶(Protein-A Sepharose)(安玛西亚生物科学公司(Amersham Biosciences), 皮斯卡塔韦, 新泽西州)亲和色谱法(1mL)从上清液中纯化抗体。用500 μ L的0.1M甘氨酸(pH 2.5)将抗体从蛋白-A柱上洗脱下来。将洗脱物在PBS(pH 7.4)中透析并且过滤灭菌。通过非还原SDS-PAGE对抗体进行分析以评估纯度和产量。通过测定280nm下的光密度来确定蛋白质浓度。

[0415] 实例18. α V β 6抗体的结构分析

[0416] 对抗体的可变重链和可变轻链测序以确定它们的DNA序列。抗- α V β 6抗体的完整序列信息与每个 γ 和 κ/λ 链组合的核苷酸和氨基酸序列一起提供在序列列表中。对可变重链序列进行分析以确定VH家族、D区序列和J区序列。然后对序列进行翻译以确定初级氨基酸序列并且与种系VH、D区和J序列进行比较以评估体细胞高变。

[0417] 表8是将抗体重链区与其同源种系重链区进行比较的表格。表9是将抗体 κ 或 λ 轻链区与其同源种系轻链区进行比较的表格。

[0418] 免疫球蛋白链的可变(V)区由多个种系DNA区段编码, 这些区段在B细胞个体发生过程中连接为功能可变区(V_HDJ_H 或 V_KJ_K)。详细研究了抗体对 α V β 6应答的分子和遗传多样性。这些测定揭示了对抗- α V β 6抗体具有特异性的若干个点。

[0419] 根据测序数据, sc 298和sc 374的重链的初级结构类似, 但不完全相同。sc 254在结构上不同于另外两者。还应当理解的是, 在特定抗体在氨基酸水平上不同于其对应的种系序列的情况下, 可以将抗体序列突变回种系序列。通过使用标准分子生物学技术, 这种纠正突变可以在一个、二个、三个或更多个位置、或任何突变位置的组合处发生。通过非限制性举例的方式, 表9显示sc 298的轻链序列(SEQ ID NO.:40)与对应的种系序列(SEQ ID

NO.:68)的不同之处在于FR1区中的Val向Ala突变(突变1)、CDR1区中的Le向Ala突变(突变2)和FR3区中的Asn向Ser突变。因此,可以修饰编码sc 298的轻链的氨基酸或核苷酸序列,以改变突变1,从而在突变1位点处产生种系序列。进一步地,可以修饰编码mAb sc 298的轻链的氨基酸或核苷酸序列,以改变突变2,从而在突变2位点处产生种系序列。再进一步,可以修饰编码mAb sc 298的轻链的氨基酸或核苷酸序列,以改变突变3,从而在突变3位点处产生种系序列。再再进一步,可以修饰编码sc 298的轻链的氨基酸或核苷酸序列,以改变突变1、突变2和突变3,从而在突变1、2和3位点处产生种系序列。再再进一步,可以修饰编码sc 298的轻链的氨基酸或核苷酸序列,以改变突变1、突变2和突变3的任何组合。在另一个实例中,在位置61处sc 264的重链(SEQ ID NO:30)与其种系(SEQ ID NO:55)不同。因此,可以将编码sc 264的重链的氨基酸或核苷酸序列从N修饰成Y,从而产生种系序列。下表10-13展示了针对sc 133、sc 188和sc 264而言来自种系的此类变化的位置。每一行表示种系和非种系残基在由粗体指示的位置处的独特组合。可以突变回种系序列的抗体序列的具体实例包括:sc 133,其中重链的氨基酸70处的L被突变回种系氨基酸M(在此称为sc 133TMT);sc 133,其中轻链的氨基酸93处的N被突变回种系氨基酸D(在此称为sc 133WDS);以及sc 264,其中轻链的氨基酸84处的A被突变回种系氨基酸D(在此称为sc 264ADY)。

[0420] 一个实施例包括修饰CDR区(即,CDR1、CDR2和/或CDR3)中的一个或多个氨基酸。在一个实例中,修饰在此描述的抗体的重链的CDR3。典型地,氨基酸被具有相似侧链的氨基酸取代(保守氨基酸取代)或者可以被任何适当的氨基酸(如丙氨酸或亮氨酸)取代。在一个实施例中,sc 264 CDR3 VATGRG DYH FYAMDV(SEQ ID NO:30的氨基酸残基100-114)可以在一个或多个氨基酸处被修饰。申请人已经证明,可以在不对活性产生不利影响的情况下修饰CDR3区,即参见sc 264RAD,其中CDR3去中的第二个G被A取代。还设想了CDR3区内的其他修饰。在另一个实施例中,sc 133CDR3区RLDV可以在一个或多个氨基酸处被修饰,包括用A取代L和/或用A取代V。取代氨基酸的手段在本领域是众所周知的并且包括定点诱变。

[0421] 另一个实施例包括替换序列中的任何结构文库,这可能影响抗体结合的异质性或特异性。在一个实例中,抗体sc 264在CDR3区中具有RGD序列,其可能引起交叉反应性结合。因此,RGD中的甘氨酸残基可以用丙氨酸替换(sc 264RAD)。

[0422]

表 8. 重链分析

链名称	SEQ ID NO:	V	D	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	49	种系			QVQLVQSGA EVKKPGASV KVSKAS	GYTFT GYYM H	WVRQ APGQG LEWM G	WINPNSG GTNYAQ KFQG	RVTMTRDTSIST AYMELSRRLRSDD TAVYYCAR	RL--	WGQG TTVT VSS
sc 133	14	VH1-2	5-12	JH6 B	QVQLVQSGA EVKKPGASV KVSKAS	GYTFT GYYM H	WVRQ APGQG LEWM G	WINPKSG DTNYAQ KFQG	RVTLTRDTSTST AYMELSRRLRSDD TAVYYCAR	RLDV	WGQG TTVT VSS
	50	种系			EVQLVESGG GLVKPGGSL RLSCAAS	GFTFS SYSM N	WVRQ APGKG LEWVS	SISSSSY IYYADSV KG	RFTISRDNAKNS LYLQMNSLRAE DTAVYYCAR	--VQLERY YYYYGM DV	WGQG TTVT VSS
sc 320	42	VH3-2 1	D1-1	JH6 B	EVQLVESGG GLVKPGGSL RLSCAAS	GYTFT NYIM H	WVRQ APGKG LEWVS	SISISSYI YYADSV KG	RFTISRDNAKNS LYLQMNSLRAE DTAVYYCAR	DPVPLER RDYYYYG MDV	WGQG TTVT VSS
	51	种系			EVQLLESGG GLVQPQGGSL RLSCAAS	GFTFS SYAM S	WVRQ APGKG LEWVS	AISGSGG STYYADS VKG	RFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAED TAVYYCAK	-VDTAMV YYGMDV V	WGQG TTVT VSS
sc 58	6	VH3-2 3	D5-5	JH6 B	EVQLLESGG GLVQPQGGSL RLSCAAS	GFTFS SYVM S	WVRQ APGKG LEWVS	AISGSGG STYYADS VKG	RFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAED TAVYYCAK	GVDTAM VTYGMD V	WGQG TTVT VSS
	52	种系			QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFTFS SYGM H	WVRQ APGKG LEWW A	VIWYDG NKYYAD SVKG	RFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAED TAVYYCAR	-IAAR--Y YYYYGM DV	WGQG TTVT VSS
sc 298	38	VH3-3	D6-6	JH6	QVQLVESGG	GFTFS	WVRQ	VIWYGGS	RFTISRDNSKNTL	DLAARR	WGQG

[0423]

链名称	SEQ ID NO:	V	D	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	
	3		B	GVVQPGGRSL RLSCAAS	SYGM H	APGKG LEWW A	NKYYAD SVKG	YLQMNSLRAED TAVYYCAR	GDYYYY GMDV	TTVT VSS		
sc 374	46	VH3-3	D6-6	JH6 B	QVQLVESGG GVVQPGGRSL RLSCAAS	GFTFS SYGM H	WVRQ APGKG LEWW A	VIWYDGS NKYYAD SVKG	RFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAED TAVYYCAR	TEGIAAR LYYYG MDV	WGQG TTVT VSS	
	53		种系		QVQLQESGP GLVKPSQTLS LTCTVS	GGSIS SGGY YWS	WIRQH PGKGL EWIG	YIYYYSGS TYYNPSL KS	RVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAAD TAVYYCAR	--GIAAAG -YYYYY GMDV	WGQG TTVT VSS	
sc 254	26	VH4-3 1	D6-13	JH6 B	QVQLQESGP GLVKPSQTLS LTCTVS	GGSIS SGGY YWS	WIRQH PGKGL EWIG	YIYYYSGS TYYNPSL KS	RVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAAD TAMYYCAR	YRGPA GRGDFY YFGMDV	WGQG TTVT VSS	
	54		种系		QVQLQESGP GLVKPSQTLS LTCTVS	GGSIS SGGY YWS	WIRQH PGKGL EWIG	YIYYYSGS TYYNPSL KS	RVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAAD TAVYYCAR	--ITIFGV FDY	WGQG TLVT VSS	
sc 49	2	VH4-3 1	D3-3	JH4 B	QVQLQESGP GLVKPSQTLS LTCTVA	GGSIR SGDY YWS	WIRQH PGKGL EWIG	NIYYYSGS TYYNPSL KS	RTISVATSRNQF SLKLTSVTAADT AVYYCAR	GGAITIFG VFDY	WGQG TLVT VSS	
	55		种系		QVQLQESGP GLVKPSQTLS LTCTVS	GGSIS SGGY YWS	WIRQH PGKGL EWIG	YIYYYSGS TYYNPSL KS	RVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAAD TAVYYCAR	VAT--YY YYYGMD V	WGQG TTVT VSS	
Sc 264	30	VH4-3 1	D4-17	JH6 B	QVQLQESGP GLVKPSQTLS	GGSIS SGGY	WIRQH PGKGL	YIYYYSGR TYYNPSL	RVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAAD	VATGRG DYHFYA	WGQG TTVT	

链名称	SEQ ID NO:	V	D	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
					LTCTVS	YWS	EWIG	KS	TAVYYCAR	MDV	VSS
56		种系			QVQLQESGP GLVKPQSQTLS LTCTVS	GGSIS SGGY YWS	WIRQH PGKGL EWIG	IYYYSGS TYYNPSL KS	RVTISVDTTSKNQ FSKLSSLVTAAD TAVYYCAR	--LRYYY YYGMDV	WGQG TTVT VSS
Sc 188	22	VH4-3 1	D4-23	JH6 B	QVQLQESGP GLVKPQSQTLS LTCTVS	GGSIS SGVY YWT	WIRQH PGNGL EWIG	IYYYSGS TSYNPSL KS	RVTISVDTTSKKQ FSLNLTTSVTAAD TAVYYCAR	EGLPLRGD YYYYGLD V	WGQG TTVT VSS
	57	种系			EVQLVQSGA EVKKPGESLK ISCKGS	GYSFT SYWI G	WVRQ MPGK GLEW MG	IYPGDSD TRYSPSF QG	QVTISADKSISTA YLQWSSLKASDT AMYYCAR	--SSGYY YAFDI	WGQG TMVT VSSA
Sc 97	10	VH5-5 1	D3-22	JH3 B	EVQLVQSGA EVKKPGESLK ISCKGS	GYSFT SYWI G	WVRQ MPGK GLEW MG	IYPGDSD TRYSPSF QG	QVILSADKSISTA YLQWSSLKASDT AMYYCAR	HDESSGY YYVFDI	WGQG TMVT VSSA
	58	种系			EVQLVQSGA EVKKPGESLK ISCKGS	GYSFT SYWI G	WVRQ MPGK GLEW MG	IYPGDSD TRYSPSF QG	QVTISADKSISTA YLQWSSLKASDT AMYYCAR	-----GMDV	WGQG TTVT VSS
Sc 277	34	VH5-5 1	D3-10	JH6 B	EVQLVQSGA EVKKPGESLK ISCKGS	GYSFP SYWI G	WVRQ MPGK GLEW MG	IYPGDSD TRYSPSF QG	QVTISADKSISTA YLQWSSLKASDT AMYYCAR	HPMEDG MDV	WGQG TTVT VSS
	59	种系			EVQLVQSGA EVKKPGESLK ISCKGS	GYSFT SYWI G	WVRQ MPGK GLEW MG	IYPGDSD TRYSPSF QG	QVTISADKSISTA YLQWSSLKASDT AMYYCAR	-GIAAG- YYGMD V	WGKG TTVT VSSA

[0424]

链名称	SEQ ID NO:	V	D	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Sc 161	18	VH5-5 1	D6-13 C	JH6	EVQLVQSGA EVKKPGESLK ISCKGS	GYSFT SYWI G	WVRQ MPGK GLEW MG	IYPGDSD TRYSPSF QG	QVTISADKSISTA YILQWSSLKASDT AMYYCAR	HGIAAAG FYYYYM DV	WGQQG TTVT VSSA

[0425]

说 明 书

表 9. 轻链分析

链名称	SEQ ID NO:	V _κ	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	J
	60	种系		DIVMTQTPL SLSVTPGQP ASISC	KSSQSLL HSDGKT YLY	WYLQKP GQPPQL LIY	EVS NRF S	GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAE DVGVYYC	MQSIQ LPWT	FGQQ TKVEI K
Sc 254	28	A2	JK1	DIVMTQTPL SLSVTPGQP ASIFC	KSSQSLL NSDGKT YLC	WYLQKP GQPPQL LIY	EVS NRF S	GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAE DVGVYYC	MQGI QLPW AF	FGQQ TKVEI K
	61	种系		EIVLTQSPG TLSLSPGER ATLSC	RASQSV SSSYLA	WYQQK PGQAPR LLY	GAS SRA T	GIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPED FAVYYC	QQYG SSPWT	FGQQ TKVEI K
sc 188	24	A27	JK1	EIVLTQSPG TLSLSPGER ATLSC	RAGQTIS SRYLA	WYQQK PGQAPR PLIY	GAS SRA T	GIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPED FAVYYC	QQYG SSPRT	FGQQ TKVEI K
sc 374	48	A27	JK1	EIVLTQSPG TLSLSPGER ATLSC	RASQSV SSSYLA	WYQQK PGQAPR LLY	GAS SRA T	DIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPED FAVYYC	QQYG SSPWT	FGQQ TKVEI K
	62	种系		EIVLTQSPG TLSLSPGER ATLSC	RASQSV SSSYLA	WYQQK PGQAPR LLY	GAS SRA T	GIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPED FAVYYC	QQYG SSPYT	FGQQ TKLEI K
Sc 49	4	A27	JK2	EIVLTQSPG TLSLSPGER ATLSC	RASQSV SSSYLA	WYQQK PGQAPR LLY	GAS SRA T	GIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPED FAVYYC	QQYG SSPCS	FGQQ TKLEI K
	63	种系		EIVLTQSPG	RASQSV	WYQQK	GAS	GIPDRFSGSGSGT	QQYG	FGPGT

[0426]

[0427]

链名称	SEQ ID NO:	V _κ	J	FR1	CDR1	FR2	CDR ₂	FR3	CDR3	J
		TLSLSPGER ATLSC		SSSYLA LLIY	PGQAPR LLIY	SRA T	DFTLTISRLEPED FAVYYC		SSPFT	KVDIK R
sc 161	20	A27	JK3	EIVLTQSPD TLSLSPGER ASLSC	WYQQK PGQAPR NRNYLV LLIY	GTS NRA T	GIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPED FAVYYC	QQCG SLPFT	FGPGT KVDIK R	

链名称	SEQ ID NO:	V _λ	J	FR1	CDR1	FR2	CDR ₂	FR3	CDR3	J
	64	种类		QSVLTQPPS VSAAPGQKV TISC	SGSSSNI GNNYVS LIY	WYQQLP GTAPKL S	GIPDRFSGSKSGT SATLGITGLQTG DEADYYC	GTWD SSLSA -YV	FGTGT KVTV	
sc 133	16	V1-19	JL1	QSVLTQPPS VSAAPGQKV TISC	SGSSSNI GNNYVS LIY	WYQQLP GTAPKL S	GIPDRFSGSKSGT SATLGITGLQTG DEADYYC	GTWN SSLSA GYV	FGTGT KVTV	
	65	种类		QSVLTQPPS VSAAPGQKV TISC	SGSSSNI GNNYVS LIY	WYQQLP GTAPKL S	GIPDRFSGSKSGT SATLGITGLQTG DEADYYC	GTWD SSLSA VV	FGGG TKLT VL	
sc 320	44	V1-19	JL2	QSVLTQPPS MSAAPGQKV VTISC	SGSSSNI GNNYVS LIY	WYQQLP GTAPKL S	GIPDRFSGSKSGT SATLGITGLQTG DEADYYC	GTWD SSLSA GV	FGGG TKLT VL	
	66	种类		SYELTQPPSV SVSPGQTARI TC	SGDALP KKYAY LVTY	WYQQK SGQQAPV S	GIPERFSGSSSGT MATLTISGAQVE DEADYYC	YSTDS SGNH VV	FGGG TKLT VL	

[0428]

sc 277	36	V2-7	JL2	SYELTQOPPSV SVSPGQTARI TC	SGDALP KKYAF	WYQQK SGQAPV LVIV	DDN KRP S	GIPERFSGSSSGT MATLTITGAQVE DEADYYC	YSTD SGHH V	FGGG TKLT VL
sc 97	12	V2-7	JL2	SYELTQOPPSV SVSPGQTARI TC	SGDALP KKYAY	WYQQK SGQAPV LVIV	EDIK RPS	GIPERFSGSSSGT MATLTISGAQVE DEADYYC	YSTD SGNH WVF	FGGG TKLT VL
	67	种系		SYELTQOPPSV SVSPGQTARI TC	SGDALP KKYAY	WYQQK SGQAPV LVIV	EDS KRP S	GIPERFSGSSSGT MATLTISGAQVE DEADYYC	YSTD SGNH VV	FGGG TKLT VL
sc 58	8	V2-7	JL3	SYELTQOPPSV SVSPGQTARI TC	SGDALP KKYAY	WYQQK SGQAPV LVIV	DDS KRP S	GIPERFSGSSSGT MATLTISGAQVE DEADYYC	YSTD SGNH RV	FGGG TKLT VL
	68	种系		SSELTQDPA VSVVALGQTV RITC	QGDSLR SYYAS	WYQQK PGQAPV LVIV	GKN NRP S	1. GIPDRFSGSS SGNTASLTITGA QAEDDEADYYC	NSRDS SGNH VV	FGGG TKLT VL
sc 298	40	V2-13	JL2	SSELTQDPV VSVVALGQTV RITC	QGDSLR SYYLS	WYQQK PGQAPV LVIV	GKN NRP S	GIPDRFSGNSG NTASLTITGAQA EDEADYYC	NSRDS SGNH L	FGGG TKLT VL
	69	种系		SYELTQOPSSV SVSPGQTARI TC	SGDVLA KKYAR	WFQQKP GQAPVL VIY	KDS ERPS	GIPERFSGSSSGT TVTLTISGAQVE DEADYYC	YSA DNNV V	FGGG TKLT VL
sc 264	32	V2-19	JL2	SYELTQOPSSV SVSPGQTARI TC	SGDVLA KKSAR	WFHQKP GQAPVL VIY	KDS ERPS	GIPERFSGSSSGT TVTLTISGAQVE DEAAYYC	YSA DNNL V	FGGG TKLT VL

[0429] 表10:在指定残基编号处sc 133重链(SEQ ID NO:14)向种系(SEQ ID NO:49)的示例性突变

[0430]

54	57	70	76
N	G	M	T
N	G	L	I
N	G	L	T
N	D	M	I
N	D	L	I
N	D	M	T
N	D	L	T
K	G	M	I
K	G	M	T
K	G	L	I
K	G	L	T
K	D	M	I
K	D	L	I
K	D	M	T

[0431] 表11:在指定残基编号处sc 188轻链(SEQ ID NO:24)向种系(SEQ ID NO:61)的示例性突变

[0432]

26	28	29	32	47
G	S	V	S	L
G	S	V	S	P
G	S	V	R	P
G	S	V	R	L
G	S	V	R	L
G	S	V	S	P
G	S	I	R	P
G	S	I	R	L
G	T	V	R	L
G	T	V	S	P
G	T	V	S	L
G	T	I	R	P
G	T	I	R	L
G	T	I	S	L
S	S	V	S	P
S	S	V	R	P

[0433]

S	S	V	R	L
S	S	V	R	L
S	S	V	S	P
S	S	I	R	P
S	S	I	R	L
S	T	V	R	L
S	T	V	S	P
S	T	V	S	L
S	T	I	R	P
S	T	I	R	L
S	T	I	S	L

[0434] 表12:在指定残基编号处sc 188重链(SEQ ID NO:22)向种系(SEQ ID NO:56)的示例性突变

[0435]

33	37	45	60	78	83	85
G	S	K	Y	N	K	S
G	S	K	Y	N	K	T
G	S	K	Y	N	N	S
G	S	K	Y	N	N	T
G	S	K	Y	K	N	S
G	S	K	Y	K	N	T
G	S	K	Y	K	K	S
G	S	K	S	N	K	T
G	S	K	S	N	K	S
G	S	K	S	N	N	S
G	S	K	S	N	N	T
G	S	K	S	K	N	S
G	S	K	S	K	N	T
G	S	K	S	K	K	S
G	S	N	Y	N	K	S
G	S	N	Y	N	K	T
G	S	N	Y	N	N	S
G	S	N	Y	N	N	T
G	S	N	Y	K	N	S
G	S	N	Y	K	N	T

[0436]

33	37	45	60	78	83	85
G	S	N	Y	K	K	S
G	S	N	Y	K	K	T
G	S	N	S	N	K	S
G	S	N	S	N	K	T
G	S	N	S	N	N	S
G	S	N	S	N	N	T
G	S	N	S	K	N	S
G	S	N	S	K	N	T
G	S	N	S	K	K	S
G	S	N	S	K	K	T
V	S	K	Y	N	K	S
V	S	K	Y	N	K	T
V	S	K	Y	N	N	S
V	S	K	Y	N	N	T
V	S	K	Y	K	N	S
V	S	K	Y	K	K	T
V	S	K	Y	K	K	S
V	S	K	S	N	K	S
V	S	K	S	N	K	T
V	S	K	S	N	N	S
V	S	K	S	N	N	T
V	S	K	S	K	N	S
V	S	K	S	K	N	T
V	S	K	S	K	K	S
V	S	K	S	K	K	T
V	S	N	Y	N	K	S
V	S	N	Y	N	K	T
V	S	N	Y	N	N	S
V	S	N	Y	N	N	T
V	S	N	Y	K	N	S
V	S	N	Y	K	N	T
V	S	N	Y	K	K	S
V	S	N	Y	K	K	T
V	S	N	S	N	K	S
V	S	N	S	N	K	T
V	S	N	S	N	N	S

[0437]

33	37	45	60	78	83	85
V	S	N	S	N	N	T
V	S	N	S	K	N	S
V	S	N	S	K	N	T
V	S	N	S	K	K	S
V	S	N	S	K	K	T
G	I	K	Y	N	K	S
G	I	K	Y	N	K	T
G	I	K	Y	N	N	S
G	I	K	Y	N	N	T
G	I	K	Y	K	N	S
G	I	K	Y	K	K	S
G	I	K	Y	K	K	T
G	I	K	S	N	K	S
G	I	K	S	N	K	T
G	I	K	S	N	N	S
G	I	K	S	N	N	T
G	I	K	S	K	N	S
G	I	K	S	K	N	T
G	I	K	S	K	K	S
G	I	N	Y	N	K	S
G	I	N	Y	N	K	T
G	I	N	Y	N	N	S
G	I	N	Y	N	N	T
G	I	N	Y	K	N	S
G	I	N	Y	K	N	T
G	I	N	Y	K	K	S
G	I	N	S	N	K	S
G	I	N	S	N	K	T
G	I	N	S	N	N	S
G	I	N	S	N	N	T
G	I	N	S	K	N	S
G	I	N	S	K	N	T
G	I	N	S	K	K	S
G	I	N	S	K	K	T

[0438]

33	37	45	60	78	83	85
V	I	K	Y	N	K	S
V	I	K	Y	N	K	T
V	I	K	Y	N	N	S
V	I	K	Y	N	N	T
V	I	K	Y	K	N	S
V	I	K	Y	K	N	T
V	I	K	Y	K	K	S
V	I	K	S	N	K	S
V	I	K	S	N	K	T
V	I	K	S	N	N	S
V	I	K	S	N	N	T
V	I	K	S	K	N	S
V	I	K	S	K	N	T
V	I	K	S	K	K	S
V	I	K	S	K	K	T
V	I	N	Y	N	K	S
V	I	N	Y	N	K	T
V	I	N	Y	N	N	S
V	I	N	Y	N	N	T
V	I	N	Y	K	N	S
V	I	N	Y	K	N	T
V	I	N	Y	K	K	S
V	I	N	Y	K	K	T
V	I	N	S	N	K	S
V	I	N	S	N	K	T
V	I	N	S	N	N	S
V	I	N	S	N	N	T
V	I	N	S	K	N	S
V	I	N	S	K	N	T
V	I	N	S	K	K	S
V	I	N	S	K	K	T

[0439] 表13:在指定残基编号处sc 264轻链(SEQ ID NO:32)向种系(SEQ ID NO:69)的示例性突变

[0440]

31	36	84
----	----	----

	Y	H	A
[0441]	Y	H	D
	Y	Q	A
	S	H	D
	S	Q	D
	S	Q	A

[0442] 实例19. $\alpha V\beta 6$ 抗体的效力测定

[0443] 为了基于其阻止HT29细胞粘附至TGF β LAP的能力区别抗体,进行以下粘附测定。

[0444] 在测定之前,将Nunc MaxiSorp(能肯公司(Nunc))板用50 μ L的10 μ g/ml TGF Beta1LAP(TGF β LAP)包被过夜,并且用3%BSA/PBS预先封闭1小时。然后将生长至最佳密度的HT29细胞沉淀并且在HBSS(具有1%BSA但是没有Mn $^{2+}$)中洗涤两次,这之后然后将细胞以30,000个细胞/孔重悬于HBSS中。将包被液从板中去除,然后将其在室温下用100 μ L 3%BSA封闭1小时并且之后用PBS洗涤两次。

[0445] 在1:3连续稀释物中准备抗体滴定,终体积为30 μ L并且处于终浓度的两倍。要注意以确保对照孔中的PBS浓度与最稀抗体孔中的PBS浓度匹配。将30 μ L的细胞添加至每个孔中,并且将细胞在V底板中在抗体的存在下在4°C下孵育40分钟。将细胞-抗体混合物转移到包被板中并且将板在37°C下孵育40分钟。然后将包被板上的细胞在温HBSS中洗涤四次,并且之后将细胞在-80°C下冷冻15分钟。允许细胞在室温下解冻,并且然后根据制造商的说明书将100 μ L的CyQuant染料/裂解缓冲液(分子探针公司)添加至每个孔中。在485nm的激发波长和530nm的发射波长下读取荧光。基于在该测定中可能的最大和最小量的细胞粘附计算每种mAb的估计IC₅₀值,如通过阳性和阴性对照孔确定的。十二种抗体的结果总结于表14中。

[0446] 表14. 粘附测定结果(估计的IC₅₀值)

[0447]

	n = 1	n = 2	n = 3
[0448]	(ng/mL)	(ng/mL)	(ng/mL)
sc 049	> 5000	> 5000	> 5000
sc 058	4065	2028	3259
sc 097	1006	281	536
sc 133	25	16	30
sc 161	2408	137	ND
sc 188	41	26	ND
sc 254	63	37	37
sc 264	26	14	18
sc 277	1455	540	720
sc 298	29	25	33
sc 320	648	381	415
sc 374	277	300	549
阳性对照 2077Z	226	185	286

[0449] 实例20. 竞争测定

[0450] 为了确定抗体能够特异性地阻断 $\alpha V\beta 6$ 整合素与可溶性TGF β LAP的结合,用纯化抗体进行竞争测定,以测量它们结合至 $\alpha V\beta 6$ 并阻断其与GST-LAP肽结合的能力。

[0451] 用50 μ L/孔的PBS中的10 μ g/ml GST-LAP和0.05%叠氮化钠包被培养基结合型96孔板(Costar,目录号3368),并且在4°C下孵育过夜。然后将板使用300 μ L/孔的测定稀释液(TBS(50mM Tris,50mM NaCl,1mM MgCl₂和1mM CaCl₂,pH 6.9)中的1%乳)洗涤三次,这之后将板使用300 μ L/孔的TBS中的5%乳封闭并且在室温下孵育30分钟。将mAb(在范围从10 μ g/ml至0.01 μ g/ml的1:3连续稀释物中)与 $\alpha V\beta 6$ (250ng/ml,在包含0.05%叠氮化钠的测定稀释液中)一起孵育过夜。第二天,将50 μ L/孔的预孵育一级抗体转移到GST-LAP肽包被的板中并且在室温下孵育一小时。然后将孔使用300 μ L/孔的测定稀释液洗涤三次。然后,为了检测结合至板上的 $\alpha V\beta 6$ 的量,以1 μ g/ml的浓度添加测定稀释液(50 μ L/孔)中的mAb 2075(Chemicon)并且在室温下孵育一小时。然后将孔使用300 μ L/孔的测定稀释液洗涤三次,并且与400ng/ml的在测定稀释液(50 μ L/孔)中的山羊抗-小鼠IgG Fc-过氧化物酶一起在室温下孵育一小时。然后将孔使用300 μ L/孔的测定稀释液洗涤三次,并且以50 μ L/孔的总体积使用1-step TMB(Neogen)使其显色。15分钟之后,将显色反应用50 μ L/孔的1N盐酸猝灭。在450nm下读取板,并且五种抗体的结果总结于图14中,其显示这些抗体能够抑制 $\alpha V\beta 6$ 与GST-LAP的结合。

[0452] 实例21. 与 $\alpha V\beta 3$ 或 $\alpha V\beta 5$ 整合素的交叉反应性

[0453] 为了确定抗体仅对 $\alpha V\beta 6$ 整合素而不对 $\alpha V\beta 3$ 或 $\alpha V\beta 5$ 整合素具有功能,进行以下测定来测试抗体抑制A375M细胞粘附至骨桥蛋白肽的能力。

[0454] 将测定板用骨桥蛋白肽包被。使用骨桥蛋白的两个片段:OPN 17-168和OPN 17-314。在测定之前,将测定板用3%BSA/PBS预先封闭一小时。将A375M细胞从培养瓶中移出,沉淀并且用包含1%BSA和1mM Ca²⁺和1mM Mg²⁺的HBSS洗涤两次。然后将细胞以30,000个细胞/孔的浓度重悬于HBSS中。除去包含骨桥蛋白片段的包被液,并且将板在室温下用100 μ L的3%BSA封闭一小时。将包被板用含有1%BSA的HBSS洗涤两次。在1:4连续稀释物中准备抗体滴定,终体积为30 μ L并且处于终浓度的两倍。将重悬细胞添加至V底板中的包含滴定抗体的孔中,并且将细胞和抗体在4°C下共孵育40分钟。然后将细胞-抗体混合物转移到包被板中,之后将其在37°C下孵育40分钟。接下来将包被板上的细胞在温HBSS中洗涤四次,并且然后将板中的细胞在-80°C下冷冻15分钟。允许细胞在室温下解冻,并且然后根据制造商的说明书将100 μ L的CyQuant染料/裂解缓冲液(分子探针公司)添加至每个孔中。在485nm的激发波长和530nm的发射波长下读取荧光。

[0455] 五种抗体的结果总结于表15中。将可商购的 αV 整合素特异性抗体在这个测定中用作阳性对照并且展示出约90%的粘附抑制。可商购的 $\alpha V\beta 6$ 抗体在这个测定中用作与 $\alpha V\beta 3$ 或 $\alpha V\beta 5$ 整合素粘附的阴性对照。在5 μ g/ml的浓度下对所有抗体进行测试并且所有测试抗体都不阻断与 $\alpha V\beta 3$ 或 $\alpha V\beta 5$ 整合素的粘附。

[0456] 表15. 与 $\alpha V\beta 3$ 或 $\alpha V\beta 5$ 整合素的交叉反应性

[0457]

抗体ID	抑制百分比
sc 133	3
sc 188	-2

sc 254	-5
sc 264	3
sc 298	9
αV对照	89
αVβ6对照	11
人IgG对照	3
小鼠IgG对照	5

[0458] 实例22.与α4β1整合素的交叉反应性

[0459] 为了确定抗体仅对αVβ6整合素而不对α4β1整合素具有功能,进行测定来测试抗体抑制J6.77细胞粘附至纤连蛋白的CS-1肽的能力。该测定如在以上实例21中所描述的进行,除了将J6.77细胞用于结合并且将纤连蛋白的CS-1肽用来包被测定板之外。

[0460] 11种抗体的结果总结于表16中。将可商购的β1整合素特异性抗体在这个测定中用作阳性对照并且展示出97%的粘附抑制。可商购的αVβ6特异性抗体在这个测定中用作与α4β1粘附的阴性对照。以5μg/ml使用所有抗体并且所有测试抗体都不阻断与α4β1的粘附。

[0461] 表16.与α4β1整合素的交叉反应性

抗体, 5 ug/ml	抑制百分比
sc 58	-14
sc 97	-7
sc 133	-15
sc 161	12
sc 188	-10
sc 254	0
sc 264	-8
sc 277	-17

抗体, 5 ug/ml	抑制百分比
sc 298	-7
sc 320	-8
sc 374	-8
人IgG1	-6
人IgG2	-9
抗-β1 整合素抗体	97
抗-αVβ6 整合素抗体	-15
在板上没有 CS-1 或抗体	12
没有抗体的情况下 CS-1 片段 包被的板	10

[0464] 实例23.与α5β1整合素的交叉反应性

[0465] 为了确定抗体仅对αVβ6整合素而不对α5β1整合素具有功能,进行粘附测定来测试抗体抑制K562细胞粘附至纤连蛋白的能力。

[0466] 将测定板用浓度为12.5 μ g/mL的纤连蛋白的FN9-10肽包被。在测定之前,将测定板用3%BSA/PBS预先封闭一小时。将K562细胞从培养瓶中移出,沉淀并且用包含1%BSA和1mM Mn²⁺的HBSS洗涤两次。然后将细胞以30,000个细胞/孔的浓度重悬于HBSS中。除去包含骨桥蛋白片段的包被液,并且将板在室温下用100 μ L的3%BSA封闭一小时。将包被板用含有1% BSA的HBSS洗涤两次。在1:4连续稀释物中准备抗体滴定,终体积为30 μ L并且处于终浓度的两倍。将重悬细胞添加至V底板中的包含滴定抗体的孔中,并且将细胞和抗体在4℃下共孵育60分钟。然后将细胞-抗体混合物转移到包被板中,之后将其在37℃下孵育40分钟。接下来将包被板上的细胞在温HBSS中洗涤四次,并且然后将板中的细胞在-80℃下冷冻15分钟。允许细胞在室温下解冻,并且然后根据制造商的说明书将100 μ L的CyQuant染料/裂解缓冲液(分子探针公司)添加至每个孔中。在485nm的激发波长和530nm的发射波长下读取荧光。

[0467] 五种抗体的结果总结于表17中。将测试抗体与作为阳性对照的可商购 α 5 β 1抗体和作为阴性对照的 α V β 6特异性抗体进行比较。所有测试抗体在该测定中在此测定中使用的5 μ g/ml浓度下都不能阻断粘附。

[0468] 表17. 与 α 5 β 1整合素的交叉反应性

[0469]

抗体ID	抑制百分比
sc 133	-12
sc 188	5
sc 254	-9
sc 264	-4
sc 298	2
α V β 6对照	7
α 5 β 1对照	78
人IgG对照	11

[0470] 实例24. 与鼠类和食蟹猴 α V β 6整合素的交叉反应性

[0471] 为了确定抗体是否对小鼠 α V β 6或食蟹猴 α V β 6展示出交叉反应性,进行以下测定。

[0472] 对于用食蟹猴或小鼠 α V、 β 6或 α V β 6瞬时转染的HEK-293细胞,使用FACS分析对纯化的mAb测试mAb与猕猴和小鼠 α V β 6的交叉反应性。转染之后大约48小时,收集细胞并且将其重悬于FACS缓冲液中,以达到100 μ L中大约50,000个细胞的终浓度。

[0473] 将总计大约100,000个细胞如下用于每个反应中。将200 μ L的293细胞分配进V底板中。将板中的细胞以1500rpm沉淀3分钟,并且然后重悬于100 μ L FACS缓冲液中。重复沉淀步骤,并且除去FACS缓冲液上清液。添加50 μ L体积的纯化mAb或对照一级抗体并且将细胞重悬。一级抗体对照是鼠类 α V β 6(Cat#MAB2077z, Chemicon) 和抗- α V和抗- β 6重组体。将板在冰上孵育45分钟,这之后添加100 μ L FACS缓冲液以稀释一级抗体。然后通过在1500rpm下离心3分钟沉淀细胞,并且将沉淀物重悬于100 μ L FACS缓冲液中。重复沉淀步骤,并且除去FACS缓冲液上清液。然后将细胞重悬于适当的二级抗体(5 μ g/ml) 和7AAD染料(10 μ g/ml) 中,并且在冰上染色7分钟。然后添加150 μ L的FACS缓冲液并且将细胞以1500rpm沉淀3分钟,这之后将细胞在100 μ L FACS缓冲液中洗涤,沉淀,并且然后重悬于250 μ L缓冲液中并且添加至FACS管中。将样品在高通量FACS机上进行分析并且使用Cell Quest Pro软件进行分析。

[0474] 结果总结于表18中,并且证明mAb sc 133和mAb sc 188明显地与小鼠和食蟹猴 α V

β_6 和 β_6 具有交叉反应性。 mAb sc 254显现与 β_6 、 αV 和 $\alpha V\beta_6$ 交叉反应。 mAb sc 264和298高水平地结合至亲本细胞,使得物种交叉反应性难以辨别。

[0475] 表18.与小鼠和食蟹猴 $\alpha V\beta_6$ 的交叉反应性

抗体	亲本	小鼠 αV	小鼠 β_6	小鼠 $\alpha V\beta_6$	食蟹猴 αV	食蟹猴 β_6	食蟹猴 $\alpha V\beta_6$
单独的细胞	0	0	0	0	1	0	0
Gt 抗小鼠	0	0	0	0	0	0	0
抗 $\alpha V\beta_6$	0	1	11	45	0	5	20
抗 αV	68	68	63	59	68	69	67
抗 β_6	0	0	0	0	0	0	0
Gt 抗人	0	0	0	0	0	0	0
人 IgG1	0	1	0	1	1	1	0
sc.133	2	4	19	49	5	10	28
sc.188	1	3	29	51	2	17	27
sc.254	8	13	21	50	16	19	26
sc.264	74	71	68	63	70	75	54
sc.298	49	45	52	53	48	52	38

[0477] 数据表示转变的细胞的百分比

[0478] 实例25.内化测定

[0479] 使用稳定表达人 $\alpha V\beta_6$ 的K562细胞系测试抗体的内化。将纯化的抗体的内化与该测定中不被内化的可商购 $\alpha V\beta_6$ 抗体进行比较。

[0480] 结果总结于表19中。

[0481] 表19.内化测定总结

[0482]

抗体	浓度 (ug/mL)	内化百分比
sc 133	10	28%
sc 133	1	30%
sc 188	10	38%
sc 188	1	34%
sc 254	10	49%
sc 254	1	39%
sc 264	10	76%
sc 264	1	77%
sc 298	10	28%
sc 298	1	26%

[0483] 实例26.高分辨Biacore分析

[0484] 针对5种 $\alpha V\beta_6$ 抗体使用用于结合固定在CM5芯片上的抗体的可溶性 $\alpha V\beta_6$ 蛋白进行

高分辨Biacore分析,以估计其对可溶性抗原的亲和力。

[0485] 如下进行Biacore分析。使用常规胺偶联来在两个CM5Biacore芯片上制备高密度山羊 α 人IgG抗体表面。将每种mAb在除气HBS-P运行缓冲液(包含100 μ g/ml BSA、1mM MgCl₂和1mM CaCl₂)中稀释至大约1 μ g/mL的浓度。更精确地,将mAb sc 133稀释至0.98 μ g/mL,将mAb sc 188稀释至0.96 μ g/mL,将mAb sc 264稀释至0.94 μ g/mL,将mAb sc 254.2稀释至0.87 μ g/mL,并且将mAb sc 298稀释至1.6 μ g/mL。然后,通过在分开的流动池中以10 μ L/min的流速在以上列出的浓度下捕获每种mAb来开发捕获水平方案。mAb sc 133、sc 298和sc 254.2被捕获30秒而mAb sc 188和sc 264被捕获1分钟。以50 μ L/min进行4分钟洗涤步骤,以稳定mAb基线。

[0486] 针对mAb sc 133、sc 188、sc 264和sc 298以116–3.6nM的浓度范围,并且针对mAb sc 254.2以233–3.6nM的浓度范围注射可溶性 α V β 6持续4分钟,其中对于每个浓度范围进行2x连续稀释。每次抗原注射后进行10分钟解离。在上述HBS-P运行缓冲液中制备抗原样品。采用用于双重参照而穿插的若干mAb捕获/缓冲液注射循环,一式三份地随机注射所有样品。在每个循环之后,以100 μ L/min的流速通过一个18秒146mM磷酸(pH 1.5)脉冲来再生高密度山羊 α 小鼠抗体表面。将50 μ L/min的流速用于所有抗原注射循环。

[0487] 然后使用CLAMP将数据拟合至包含质量转运项(term for mass transport)的1:1相互作用模型。所得结合常数列于表20中。从最高到最低亲和力列出mAb。

[0488] 表20.来源于高分辨BiacoreTM的克隆的和纯化的mAb的亲和力测定结果。

[0489]	抗体	R最大	k _a ($M^{-1}s^{-1}$)	K _d (s^{-1})	K _D (nM)
	sc 264	96	5.85X 10 ⁴	3.63X 10 ⁻⁴	6.2
	sc 298	77	5.65X 10 ⁴	1.18X 10 ⁻³	21.0
	sc 188	76	4.52X 10 ⁴	9.56X 10 ⁻⁴	21.2
	sc 133	96	5.73X 10 ⁴	1.89X 10 ⁻³	33.0
	sc 254.2	53、45	5.73X 10 ⁴	5.64X 10 ⁻⁴	34.9

[0490] 实例27. 使用FACS的结合亲和力分析

[0491] 作为Biacore的替代方案,还使用FACS分析来估计抗体之一对稳定表达人 α V β 6抗原的K562细胞的结合亲和力。滴定抗原的量以产生结合曲线并且估计对抗原的结合亲和力。

[0492] 将表达 α V β 6的K562细胞以大约600万个细胞/mL的浓度重悬于包含1mM的MgCl₂和1mM的CaCl₂的经过滤的HBS缓冲液中。将细胞保存在冰上。将纯化的mAb sc 188以因子1:2连续稀释在96孔板中的11个孔的HBS中。每一行中的第12个孔仅包含缓冲液。一式三份地进行滴定。将另外的HBS和细胞添加至每个孔中,使得终体积是300 μ l/孔并且每个孔包含大约120,000个细胞。mAb sc188的最终分子量浓度范围是4.9–0.019nM。将板在板摇床中于4°C下放置5小时,这之后使板自旋并且用HBS洗涤三次,之后将200 μ L的131nM Cy5山羊 α -人多克隆抗体(杰克逊实验室(Jackson Laboratories),#109-175-008)添加至每个孔中。然后将板在4°C下振荡40分钟,并且之后自旋并且再一次用HBS洗涤三次。使用FACSCalibur仪记录每个mAb浓度的20,000个“事件”的几何平均荧光(GMF),并且取相应的一式三份滴定点的平均值以给出每个mAb浓度的一个GMF点。使用以下等式用科学家(Scientist)软件非线性地拟合作为分子mAb浓度的函数的平均GMF图:

$$[0493] \quad F = P' \frac{(K_D + L_T + n \cdot M) - \sqrt{(K_D + L_T + n \cdot M)^2 - 4n \cdot M \cdot L_T}}{2} + B$$

[0494] 在上面的等式中, F =几何平均荧光, L_T =总分子mAb浓度, P' =使任意荧光单位与结合的mAb相关的比例常数, M =以摩尔浓度计的细胞浓度, n =每个细胞的受体数目, B =背景信号, 并且 K_D =平衡解离常数。对于mAb sc 188, 获得了作为 P' 的 K_D 估计值, 允许 n 、 B 和 K_D 在非线性分析中自由浮动。

[0495] 具有其非线性拟合(红线)的所得图示于图15中。表21列出了mAb sc 188的所得 K_D 连同拟合的95%置信区间。mAb sc 188的这些结果指示与一种类型的受体的结合。

[0496] 通过FACS测定的对sc 188的结合亲和力比通过Biacore测定(实例26)的显著更强。对于sc 188的 K_D 值的差异至少有两种可能的解释。第一个原因是两个测定使用了不同形式的该抗原用于测量-Biacore使用可溶性抗原而FACS分析使用抗原的细胞结合形式。第二个原因是被测试的抗体相对于抗原的细胞结合形式是增高的并且可能不会以高亲和力结合至可溶性抗原, 因为它们结合至细胞结合的抗原。

[0497] 表21. 使用FACS的结合亲和力分析

[0498]	抗体	K_D (pM)	95%CI (pM)
	sc 188	51.9	+22.7

[0499] 实例28.CDC测定

[0500] 以上实例中描述的纯化抗体属于IgG1同种型并且可以具有效应子功能。为了确定这些抗体介导补体依赖性细胞毒性(CDC)的能力, 使用稳定表达 $\alpha V\beta 6$ 的293细胞(293-10A11)和亲本293细胞(293F)进行以下测定。

[0501] 对于细胞的钙黄绿素染色, 将各自大约 25×10^6 个HT29、293-10A11和293F细胞的等分部分单独地重悬于3ml无血清RPMI培养基中。然后将45 μ L的1mM钙黄绿素添加至每3ml的细胞样品中, 并且将样品在37°C下孵育45分钟。将细胞以1200xRPM离心3分钟, 弃去上清液并且将细胞重悬于各自对应的细胞系培养基中。重复离心步骤并且将细胞重悬, 以给出50 μ L培养基中约100,000个细胞的终浓度。

[0502] 在V底96孔板中制备每种抗体的1:2连续稀释物, 其中浓度范围从20 μ g/ml至0.625 μ g/ml, 体积为50 μ L。然后, 将如上所述制备的100,000个细胞以50 μ L的体积添加至包含抗体的板中, 并且将所得混合物在冰上孵育两小时。孵育之后, 将细胞沉淀, 并且弃去上清液。将细胞重悬于其对应的包含10%人血清(ABI供体#27)的100 μ L培养基中, 并且在37°C下孵育30分钟。然后将细胞离心, 并且将80 μ L的上清液转移到FMAT板中。在Tecan读取器上使用485nm的激发波长和530nm的发射波长读取板。

[0503] 结果总结在图16A-3E中, 并且证明测试的每种纯化抗体在稳定表达 $\alpha V\beta 6$ 整合素的293细胞中都能介导CDC。

[0504] 实例29. 定点诱变

[0505] 制备自免疫(实例1)的抗体之一(sc 264)在TGF β LAP结合抑制测定中显示出强的体外功能性阻断活性(参见实例4), 但是与非 $\alpha V\beta 6$ 表达型细胞系展示出交叉反应性结合(参见实例24)。这种抗体sc 264在CDR3区中具有RGD序列, 其被推测为负责交叉反应性结合。因此, 使用定点诱变来将RGD中的甘氨酸残基用丙氨酸替换(sc 264RAD)。

[0506] 第二抗体(sc 188)在FR3区内具有糖基化位点。通过定点诱变消除这个位点,从NLT取代成KLT(sc 188SDM)。然后如描述于实例7和8中的对这两种抗体的突变形式进行表达和纯化,并且如在以下实例中所述对纯化的抗体进行分析。

[0507] 实例30.用于测试突变型抗体的交叉反应性结合的结合测定

[0508] 进行结合测定以测试在实例24中观察到的交叉反应性结合是否因sc 264的定点诱变而减少。对293T和293F细胞系分析抗体的结合,以便测试从sc 264中去除RGD位点与原始抗体相比是否导致结合降低。

[0509] 收集之后将293T和293F细胞旋降并且重悬于具有1%BSA和1mM CaCl₂和1mM MgCl₂的HBSS(洗涤缓冲液)中,使得至少150,000个细胞被用于每个反应中。细胞在反应之间在V底96孔板(莎斯特公司(Sarstedt))中分开,并且将板中的细胞以1500rpm沉淀3分钟,这之后除去HBSS上清液。在表19中指定的浓度下添加50μL体积的一级抗体,并且将细胞重悬并且之后在冰上孵育60分钟。孵育之后,通过在1500rpm下离心3分钟使细胞沉淀,重悬于100μL洗涤缓冲液中,并且然后再次沉淀。然后将细胞重悬于2μg/ml的具有10μg/ml 7AAD的适当二级抗体中,并且在冰上染色7分钟,这之后添加150μL的洗涤缓冲液,并且使细胞在1500rpm下沉淀3分钟并且然后重悬于具有1%BSA的100μL的HBSS中。在附接有HTS的FACS仪上读取样品并且使用Cell Quest Pro软件对数据进行分析。结果总结在表22中,并且数据作为任意单位的几何平均转变值出现。这些数据证明在测试的所有浓度下,与原始mAb sc 264相比,sc 264RAD与亲本293T细胞具有显著较少的结合。

[0510] 表22.突变抗体与亲本细胞的交叉反应性。

抗体	浓度 (μg/ml)	293T 细胞	293T-αVβ6 细胞
无	n/a	3	2
小鼠 IgG2a	20	27	8
人 IgG1	20	4	4
抗-aVb6	20	4	5
sc 264	20	433	6673
sc 264 RAD	20	44	7241

抗体	浓度 (μg/ml)	293T 细胞	293T-αVβ6 细胞
sc 188	20	27	6167
sc 188 SDM	20	25	6758
sc 264	5	88	6418
sc 264 RAD	5	13	6840
sc 188	5	9	5822
sc 188 SDM	5	9	6822
sc 264	1.25	24	6230
sc 264 RAD	1.25	7	4890
sc 188	1.25	6	6395
sc 188 SDM	1.25	5	4532

[0513] 实例31.突变型抗体的效力分析

[0514] 为了确定抑制TGFβLAP介导的HT-29细胞粘附所需的突变型αVβ6抗体的浓度

(IC₅₀) ,进行以下测定。

[0515] 在测定之前,将Nunc MaxiSorp (能肯公司) 板用50μL的10μg/ml TGF Beta1LAP (TGFβLAP) 包被过夜,并且用3%BSA/PBS预先封闭1小时。然后将生长至最佳密度的HT29细胞沉淀并且在HBBS (具有1%BSA并且具有1mM Ca²⁺和1mM Mg²⁺) 中洗涤两次,这之后然后将细胞以30,000个细胞/孔重悬于HBSS中。将包被液从板中去除,然后将其在室温下用100μL 3%BSA封闭1小时并且之后用PBS洗涤两次。

[0516] 在1:4连续稀释物中准备抗体滴定,终体积为30μL并且处于终浓度的两倍。要注意以确保对照孔中的PBS浓度与最稀抗体孔中的PBS浓度匹配。将30μL的细胞添加至每个孔中,并且将细胞在V底板中在抗体的存在下在4℃下孵育40分钟。将细胞-抗体混合物转移到包被板中并且将板在37℃下孵育40分钟。然后将包被板上的细胞在温HBSS中洗涤四次,并且之后将细胞在-80℃下冷冻15分钟。允许细胞在室温下解冻,并且然后根据制造商的说明书将100μL的CyQuant染料/裂解缓冲液(分子探针公司)添加至每个孔中。在485nm的激发波长和530nm的发射波长下读取荧光。十二种抗体的结果总结于表23中,并且证明突变型抗体的IC₅₀一致地小于各自原始抗体的IC₅₀。

[0517] 表23. 抑制TGFβLAP介导的HT29细胞粘附所需的突变型抗体的浓度 (IC₅₀) 。

	n = 1 (ng/ml)	n = 2 (ng/ml)	n = 3 (ng/ml)
[0518]	sc.264 113	96	55
	sc.264		
	RAD 13	13	39
	sc.264 57	89	46
	sc.188 125	157	64
	sc.188 SDM 22	24	67

[0519] 实例32. 突变型抗体与α4β1整合素的交叉反应性

[0520] 为了确定突变型抗体仅对αVβ6整合素而不对α4β1整合素具有功能,进行测定来测试抗体抑制J6.77细胞粘附至纤连蛋白的CS-1肽的能力。如下所述的进行测定。

[0521] 将测定板用纤连蛋白的CS-1肽包被。在测定之前,将测定板用3%BSA/PBS预先封闭一小时。使J6.77细胞生长至汇合,然后从培养瓶中移出,沉淀并且用HBSS洗涤三次。然后将细胞以30,000个细胞/孔的浓度重悬于HBSS中。除去包含纤连蛋白片段的包被液,并且将板在室温下用100μL的3%BSA封闭一小时。将包被板用HBSS洗涤三次。在1:4连续稀释物中准备抗体滴定,终体积为30μL并且处于终浓度的两倍。将重悬细胞添加至V底板中的包含滴定抗体的孔中,并且将细胞和抗体在4℃下共孵育40分钟。然后将细胞-抗体混合物转移到包被板中,之后将其在37℃下孵育40分钟。接下来将包被板上的细胞在温HBSS中洗涤四次,并且然后将板中的细胞在-80℃下冷冻15分钟。允许细胞在室温下解冻,并且然后根据制造商的说明书将100μL的CyQuant染料/裂解缓冲液(分子探针公司)添加至每个孔中。在485nm的激发波长和530nm的发射波长下读取荧光。

[0522] 两种突变型抗体及其非突变的对应物的结果总结在表24中。将可商购的β1整合素特异性抗体在这个测定中用作阳性对照并且展示出95%的粘附抑制。可商购的αVβ6特异性

抗体在这个测定中用作与 $\alpha 4\beta 1$ 粘附的阴性对照。以5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 使用所有抗体并且所有测试抗体都不阻断与 $\alpha 4\beta 1$ 的粘附。

[0523] 表24. 与 $\alpha 4\beta 1$ 整合素的交叉反应性

抗体, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	抑制百分比
sc.188	2
sc.188SDM	-6
sc.264	-30
sc.264RAD	-2
人IgG1	26
人IgG2	13
人IgG4	15
抗- $\beta 1$ 整合素	95

[0525] 实例33. 突变型抗体与 $\alpha 5\beta 1$ 整合素的交叉反应性

[0526] 为了确定突变型抗体仅对 $\alpha V\beta 6$ 整合素而不对 $\alpha 5\beta 1$ 整合素具有功能, 进行测定来测试抗体抑制K562细胞粘附至纤连蛋白的能力。如在实例14中所述的进行测定。结果总结在表25中, 并且证明所有测试抗体都不能阻断粘附至 $\alpha 5\beta 1$ 。

[0527] 表25. 与 $\alpha 5\beta 1$ 整合素的交叉反应性。

抗体ID	抑制%
sc 188	-5
sc 188SDM	-8
sc 264	3
sc 264RAD	6
$\alpha V\beta 6$ 对照	-16
$\alpha 5\beta 1$ 对照	78
人IgG对照	-12

[0529] 实例34. 突变型抗体与小鼠和食蟹猴 $\alpha V\beta 6$ 整合素的交叉反应性

[0530] 为了确定突变型 $\alpha V\beta 6$ 特异性抗体是否对小鼠 $\alpha V\beta 6$ 或食蟹猴 $\alpha V\beta 6$ 展示出交叉反应性, 进行以下测定。

[0531] 收集之后将K562亲本细胞或表达食蟹猴或小鼠 $\alpha V\beta 6$ 的K562细胞旋降并且重悬于具有1% BSA和1mM CaCl₂和1mM MgCl₂的HBSS (洗涤缓冲液) 中, 使得至少150,000个细胞被用于每个反应中。细胞在反应之间在V底96孔板(莎斯特公司(Sarstedt))中分开, 并且将板中的细胞以1500rpm沉淀3分钟, 这之后除去HBSS上清液。添加50 μL 体积的一级抗体, 并且将细胞重悬并且之后在冰上孵育60分钟。孵育之后, 通过在1500rpm下离心3分钟使细胞沉淀, 重悬于100 μL 洗涤缓冲液中, 并且然后再次沉淀。然后将细胞重悬于2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的具有10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 7AAD的适当二级抗体中, 并且在冰上染色7分钟, 这之后添加150 μL 的洗涤缓冲液, 并且使细胞在1500rpm下沉淀3分钟并且然后重悬于具有1% BSA的100 μL 的HBSS中。在附接有HTS的FACS仪上读取样品并且使用Cell Quest Pro软件对数据进行分析。结果总结在表26中, 并且数据作为任意单位的几何平均转变值出现。这些数据证明在测试的浓度下, sc 264RAD和sc 188SDM对小鼠和食蟹猴 $\alpha V\beta 6$ 展示出交叉反应性。

[0532] 表26.与小鼠和食蟹猴 $\alpha V\beta 6$ 的交叉反应性

抗体	亲本	小鼠 $\alpha V\beta 6$	食蟹猴 $\alpha V\beta 6$
单独的细胞	3	3	3
Gt 抗小鼠	5	6	7
抗 $\alpha V\beta 6$	15	122	84
抗 αV	109	144	163
抗 $\beta 6$	26	43	37
小鼠 IgG2a	23	36	25
小鼠 IgG1	12	20	13
Gt 抗人	7	12	7
人 IgG1	46	108	54
sc 133	57	246	154
sc 188	55	227	139

[0533]

sc 188 SDM	47	219	142
sc 254	98	260	190
sc 264	33	160	121
sc 264 RAD	48	196	139
sc 298	33	150	97

[0534]

[0535] 实例35.内化测定

[0536] 使用稳定表达人 $\alpha V\beta 6$ 的K562细胞系测试突变型抗体的内化。如在实例24中所述的进行测定。将纯化的抗体的内化与该测定中不被内化的可商购 $\alpha V\beta 6$ 抗体进行比较。

[0537] 结果总结在表27中，并且证明sc 264RAD突变型抗体的内化显著低于非突变的sc 264。

[0538] 表27.内化测定总结

[0539]

抗体	浓度 ($\mu g/ml$)	内化百分比
sc 264	10	75%
sc 264	1	47%
sc 264RAD	10	42%
sc 264RAD	1	31%
sc 188	10	18%
sc 188	1	27%
sc 188SDM	10	22%
sc 188SDM	1	17%

[0540]

[0536] 使用FACS进行sc 264RAD的结合亲和力分析

[0541] 如在实例18中所述的测量sc 264RAD抗体对 $\alpha V\beta 6$ 的结合亲和力。这个测定的结果总结在表28中，并且证明sc 264RAD抗体具有 $<50 pM$ 的亲和力。

[0542] 表28. 使用FACS的结合亲和力分析

mAb样品	K _D (pM)	95%CI (pM)
sc 264RAD	46.3	+15.9

[0544] 实例37.sc 264RAD与sc 264RAD/ADY的活性比较

[0545] 在底特律-562粘附测定中比较sc 264RAD抗体和264RAD的种系(GL) 版本264RAD/ADY(在轻链中包含突变A84D) 的活性。

[0546] 将板用0.5μg/ml GST-TGF-β LAP融合蛋白在4°C下包被过夜并且第二天早晨,洗涤并且然后用3%BSA/PBS封闭1小时。然后允许底特律-562细胞(25000个细胞/孔) 在包含2mM MgCl₂的HBSS中在37°C下与板粘附45分钟。45分钟之后,将板在PBS中洗涤三次并且然后在乙醇中固定。将细胞通过用Hoescht染色而可视化并且通过在Cellomics Arrayscan II上对每孔的结合细胞的数目计数来定量。

[0547] 示于图18中的数据指示sc 264RAD和sc 264RAD/ADY两者具有相似的活性并且阻断αVβ6功能的能力在修饰的抗体中得到维持。

[0548] 实例38.生长研究

[0549] 为了确定抗体264RAD、133和188SDM在体内阻断avb6功能,测试各自抑制αVβ6阳性肿瘤异种移植物生长的能力。一个这样的模型是底特律-562鼻咽细胞系,它表达αVβ6并且还生长为皮下肿瘤异种移植物。

[0550] 在具有厄尔(Earle) BSS和2mM L-Glu+1.0mM丙酮酸钠、0.1mM NEAA+1.5g/L碳酸氢钠+10%FBS的EMEM中培养底特律562细胞。收获细胞并且使其重悬于50%PBS+50%基质胶中。然后将悬液液以0.1ml的体积植于右肋腹内(5×10^6 /小鼠)。动物是6-8周龄的NCR雌性裸鼠。当肿瘤达到0.1cm³时开始给药并且每周以20mg/kg给药一次,持续研究的持续时间。

[0551] 所有三种抗体都抑制肿瘤生长(参见图17)。264RAD是最有效的,然后是133和188。该数据清楚地显示,抗体264RAD、133和188在体内具有活性并且能够依赖于生长过程中的αVβ6信号传导减少肿瘤生长。

表 29 示例性抗体重链氨基酸序列

[0552]

链名称	SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
sc 264 RAD	75	QVQLQESGP GLVKPSPQTL SLTCTVS	GGSISS SGGYY WS	WIRQHPGKGLE WIG	YIYYSGRTY NNPSLKS	RVTISVDTSKKNQFS LKLSVVTAADTA YYCAR	VATGRA DYHFYA MDV	WGQGT TVTVSS
sc 264 RAD/A DY	95	QVQLQESGP GLVKPSPQTL S LTCTVS	GGSISS GGYY WS	WIRQHPGKGLE WIG	YIYYSGRTY NNPSLKS	RVTISVDTSKKNQFS LKLSVVTAADTA YYCAR	VATGRA DYHFYA MDV	WGQGT TVTVSS
sc 188 SDM	71	QVQLQESGP GLVKPSPQTL S LTCTVS	GGSISS GVYY WT	WIRQHPGNGLE WIG	YIYYSGSTS NPSLKS	RVTISVDTSKKKQFS LKLTTSVTAADTA YYCAR	EGLRGD YYYGLD V	WGQGT TVTVSS
sc 133 TMT	79	QVQLVQSGA EVKKPGASV KVSKCAS	GYTFT GYYM H	WVRQAPGQGL EWMG	WINPKSGDT NYAQKFQG	RVTMTRDTSTSTAY MELSRRLRSDDTA YYCAR	RLDV	WGQGT TVTVSS
sc 133 WDS	83	QVQLVQSGA EVKKPGASV KVSKCAS	GYTFT GYYM H	WVRQAPGQGL EWMG	WINPKSGDT NYAQKFQG	RVTMTRDTSTSTAY MELSRRLRSDDTA YYCAR	RLDV	WGQGT TVTVSS
sc 133 TMT/W DS	87	QVQLVQSGA EVKKPGASV KVSKCAS	GYTFT GYYM H	WVRQAPGQGL EWMG	WINPKSGDT NYAQKFQG	RVTMTRDTSTSTAY MELSRRLRSDDTA YYCAR	RLDV	WGQGT TVTVSS

表 30 示例性抗体轻链氨基酸序列

[0553]

链名称	SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
sc 264 RAD	77	SYELTQPSSV SVSPGQTARI TC	SGDVL AKKSA R	WFHQKPGQAP VLVIY	KDSERPS	GPERFSGSSSGTIV TLTISGAQVEDEAA YYC	YSAADN NLV	FGGGTK LTVL
sc 264 RAD/A DY	97	SYELTQPSSV SVSPGQTARI TC	SGDVL AKKSA R	WFHQKPGQAP VLVIY	KDSERPS	GPERFSGSSSGTIV TLTISGAQVEDEAD YYC	YSAADN NLV	FGGGTK LTVL
sc 188 SDM	73	EIVLTQSPGT LSSLSPGERAT LSC	RAGQT ISSRYL A	WYQQKPGQAP RPLIY	GASSRAT	GIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLPEPEDFAVY YC	QQYGSSP RT	FGQGKT VEIK
sc 133 TMT	81	QSVLTQPPSV SAAPGQKVTTI SC	SGSSS NIGNN YVS	WYQQQLPGTAP KLLIY	DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSA TLGITGLQTGDEAD YYC	GTWNSSL SAGYV	FGTGKT VTVL
sc 133 WDS	85	QSVLTQPPSV SAAPGQKVTTI SC	SGSSS NIGNN YVS	WYQQQLPGTAP KLLIY	DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSA TLGITGLQTGDEAD YYC	GTWDSSL SAGYV	FGTGKT VTVL
sc 133 TMT/W DS	89	QSVLTQPPSV SAAPGQKVTTI SC	SGSSS NIGNN YVS	WYQQQLPGTAP KLLIY	DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSA TLGITGLQTGDEAD YYC	GTWDSSL SAGYV	FGTGKT VTVL

[0554] 参考文献

[0555] 1. 瓦尔登 Y (Varden Y)、斯利威克斯 MX (Sliwkowski MX). 解开 ErbB 信号传导网

(Untangling the ErbB signalling network).自然评论分子细胞生物学(Nat Rev Mol Cell Biol.) 2001;2:127-137。

[0556] 2. 斯拉蒙DJ(Slamon DJ)、克拉克GM(Clark GM)、王SG(Wong SG)等人类乳腺癌:复发和存活与HER-2/neu癌基因扩增的相关性(Human breast cancer:correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene).科学(Science).1987;235:177-182。

[0557] 3. 斯拉蒙DJ(Slamon DJ)、高多芬W(Godolphin W),琼斯LA(Jones LA)等人类乳腺癌和卵巢癌中的HER-2/neu原癌基因研究(Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer).科学(Science).1989;244:707-712。

[0558] 4. 王AL(Wong AL)、李SC(Lee SC).曲妥珠单抗耐药机制以及HER2阳性乳腺癌中的新型治疗策略(Mechanisms of Resistance to Trastuzumab and Novel Therapeutic Strategies in HER2-Positive Breast Cancer).国际乳腺癌杂志(Int J Breast Cancer).2012;2012:415170。

[0559] 5. 皮卡特-格布哈特MJ(Piccart-Gebhart MJ)、普克特M(Procter M)、利兰-琼斯B(Leyland-Jones B)等人HER2阳性乳腺癌辅助化疗后的曲妥珠单抗(Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer).新英格兰医学杂志(N Eng/J Med.) 2005;353:1659-1672。

[0560] 6. 洛蒙德EH(Romond EH)、佩雷斯EA(Perez EA)、布莱恩特J(Bryant J)等人用于可操作HER2阳性乳腺癌的曲妥珠单抗加辅助化疗(Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer).新英格兰医学杂志(N Eng/J Med.) 2005;353:1673-1684。

[0561] 7. 阿里瓦斯J(Arribas J)、巴塞尔加J(Baselga J)、佩德森K(Pedersen K)、帕拉-帕劳JL(Parra-Palau JL).p95HER2和乳腺癌(p95HER2and breast cancer).癌症研究(Cancer Res.) 2011;71:1515-1519。

[0562] 8. 加里亚D(Gajria D)、昌达尔拉帕蒂S(Chandarlapaty S).HER2扩增的乳腺癌:曲妥珠单抗耐药机制和新型靶向疗法(HER2-amplified breast cancer:mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies).抗癌疗法名家综述(Expert Rev Anticancer Ther.) 2011;11:263-275。

[0563] 9. 林斯利CW(Lindsley CW)、巴尼特SF(Barnett SF)、雷顿ME(Layton ME)、比洛MT(Bilodeau MT).P13K/Akt途径:ATP竞争性和变构性Akt蛋白激酶抑制剂研发的最新进展(The P13K/Akt pathway:recent progress in the development of ATP-competitive and allosteric Akt kinase inhibitors).当前癌症药物靶标(Curr Cancer Drug Targets).2008;8:7-18。

[0564] 10. 上田Y(Ueda Y)、王S(Wang S)、杜蒙特N(Dumont N)等人HER2(erbB2)在人乳腺上皮细胞的过表达撕下转化生长因子 β 诱导的细胞运动的面具(Overexpression of HER2(erbB2) in human breast epithelial cells unmasks transforming growth factor beta-induced cell motility).生物化学杂志(J Bioi Chem).2004;279:24505-24513。

[0565] 11. 王SE(Wang SE)、信I(Shin I)、吴FY(Wu FY)、弗里德曼DB(Friedman DB)、阿特亚加CL(Arteaga CL).向Rac1-Pak1的HER2/Neu(ErbB2)信号传导受转化生长因子 β 的时空

调节(HER2/Neu(ErbB2)signaling to Rac1-Pak1is temporally and spatially modulated by transforming growth factor beta).癌症研究(Cancer Res.)2006;66:9591-9600。

[0566] 12.村冈RS(Muraoka RS)、高Y(Koh Y)、罗巴克LR(Roebuck LR)等人过表达具活性转化生长因子 β 1的恶性增加的Neu诱导的乳腺肿瘤(Increased malignancy of Neuinduced mammary tumors overexpressing active transforming growth factor beta1).分子细胞生物学(Mol Cell Biol.)2003;23:8691-8703。

[0567] 13.里昂RM(Lyons RM)、金特里LE(Gentry LE)、卜基奥AF(Purchio AF)、摩西HL(Moses HL).纤溶酶对潜伏性重组转化生长因子 β 1的激活机制(Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1by plasmin).细胞生物学杂志(J Cell Biol.)1990;110:1361-1367。

[0568] 14.芒格JS(Munger JS)、黄X(Huang X)、川胜H(Kawakatsu H)等人整合素 $\alpha v\beta 6$ 结合并活化潜伏性TGF β 1:用于调节肺部炎症和纤维化的机制(The integrin alpha v beta 6binds and activates latent TGF beta 1:a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis).细胞(Cell).1999;96:319-328。

[0569] 15.黑兹尔巴格S(Hazelbag S)、肯特GG(Kenter GG)、高特A(Gorter A)等人 $\alpha v\beta 6$ 整合素在宫颈鳞状细胞癌中的过表达是存活下降的预后因素(Overexpression of the alpha v beta 6integrin in cervical squamous cell carcinoma is a prognostic factor for decreased survival).病理学杂志(J Pathol.)2007;212:316-324。

[0570] 16.贝茨RC(Bates RC)、贝拉文D1(Bellovin D1)、布朗C(Brown C)等人上皮间质转化过程中整合素 $\beta 6$ 的转录激活定义攻击性结肠癌的预后指标(Transcriptional activation of integrin beta6during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma).临床研究杂志(J Clin Invest.)2005;115:339-347。

[0571] 17.艾莱阿迪AN(Elayadi AN)、萨米利KN(Samli KN)、普鲁道金L(Prudkin L)等人通过生物淘选鉴定的肽将整合素 $\alpha v\beta 6$ 鉴定为非小细胞肺癌的预后生物标志物(A peptide selected by biopanning identifies the integrin alphavbeta6as a prognostic biomarker for nonsmall cell lung cancer).癌症研究(Cancer Res.)2007;67:5889-5895。

[0572] 18.布雷乌斯JM(Breuss JM)、加洛J(Gallo J)、德利斯尔HM(Delisser HM)等人 $\beta 6$ 整合素亚基在发育、瘤形成和组织修复中的表达暗示了在上皮重塑中的作用(Expression of the beta 6integrin subunit in development,neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling).细胞科学杂志(J Cell Sci.)1995;108(Pt6):2241-2251。

[0573] 19.凡阿尔森LA(Van Aarsen LA)、塞拉利昂DR(Leone DR)、霍S(Ho S)等人抗体介导的整合素 $\alpha v\beta 6$ 的阻断在体内通过转化生长因子- β -调节机制抑制肿瘤进展(Antibody-mediated blockade of integrin alpha v beta 6inhibits tumor progression in vivo by a transforming growth factor-beta-regulated mechanism).癌症研究(Cancer Res.)2008;68:561-570。

- [0574] 20. 胡M(Hu M)、姚J(Yao J)、卡罗尔DK(Carroll DK)等人浸润性乳腺癌转移的原位调控(Regulation of *in situ* to invasive breast carcinoma transition). *癌细胞*(Cancer Cell). 2008;13:394-406。
- [0575] 21. 海因斯R0(Hynes R0). 整合素:双向、变构信号传导机器(Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines). *细胞*(Cell). 2002;110:673-687。
- [0576] 22. 库马尔CC(Kumar CC). 通过整合素受体进行的信号传导(Signaling by integrin receptors). *癌基因*(Oncogene). 1998;17:1365-1373。
- [0577] 23. 麦克沙恩LM(McShane LM)、奥特曼DG(Altman DG)、萨奥尔布雷W(Sauerbrei W)等人对肿瘤标志物预后研究的报告建议(注)(Reporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK)). *欧洲癌症杂志*(Eur J Cancer.) 2005;41:1690-1696。
- [0578] 24. 拉克哈EA(Rakha EA)、EI-雷亨姆DA(EI-Rehim DA)、帕里什C(Paish C)等人基底表型鉴定具有临床意义的乳腺癌预后不良亚组(Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance). *欧洲癌症杂志*(Eur J Cancer.) 2006;42:3149-3156。
- [0579] 25. Abd EI-雷亨姆OM(Abd EI-Rehim OM)、平德SE(Pinder SE)、帕里什CE(Paish CE)等人管腔和基底细胞角蛋白在人类乳腺癌中的表达(Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma). *病理学杂志*(J Pathol.) 2004;203:661-671。
- [0580] 26. 柯蒂斯C(Curtis C)、沙阿SP(Shah SP)、秦SF(Chin SF)等人2000个乳腺肿瘤的基因组和转录组结构揭示了新型亚组(The genomic and transcriptomic architecture of 2,000breast tumours reveals novel subgroups). *自然*(Nature). 2012;486:346-352。
- [0581] 27. 克劳德MJ HD(Crowder MJ HD). 统计与应用概率专论(Monographs on Statistics and Applied Probability). 1, Editor, editor" editors. 伦敦:查普曼和霍尔公司(London:Chapman&Hall); 1990。
- [0582] 28. 刘易斯GO(Lewis GO)、洛夫格伦JA(Lofgren JA)、麦克默特里AE(McMurtry Ae)等人调蛋白对人类乳腺癌和卵巢肿瘤细胞的生长调节:在介导调蛋白反应性中需要ErbB2作为关键组分的证据(Growth regulation of human breast and ovarian tumor cells by heregulin: Evidence for the requirement of ErbB2as a critical component in mediating heregulin responsiveness). *癌症研究*(Cancer Res.) 1996; 56:1457-1465。
- [0583] 29. 埃伯莱C(Eberlein C)、肯德鲁J(Kendrew J)、克戴德K(McDaid K)等人靶向 α v β 6整合素的人类单克隆抗体264RAD在体内减少肿瘤生长和转移并调节关键生物标志物(A human monoclonal antibody 264RAD targeting alphavbeta6integrin reduces tumour growth and metastasis, and modulates key biomarkers *in vivo*). *癌基因*(Oncogene). 2012。
- [0584] 30. 斯拉蒙OJ(Slamon OJ)、利兰-琼斯B(Leyland-Janes B)、谢克S(Shak S)等人化疗加HER2单克隆抗体用于过表达HER2的转移性乳腺癌的用途(Use of chemotherapy

plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2). 新英格兰医学杂志 (N Eng J Med.) 2001;344:783-792。

[0585] 31. 瓦尔登V (Varden V) . HER2生物学及其在乳腺癌的重要性 (Biology of HER2 and its importance in breast cancer) . 肿瘤学 (Oncology) . 2001;61增刊2:1-13。

[0586] 32. 克拉克AS (Clark AS) 、韦斯特K (West K) 、施特赖歇尔S (Streicher S) 、丹尼斯PA (Dennis PA) . 乳腺癌细胞中的组成型和诱导型Akt活性促进对化疗、曲妥珠单抗和他莫昔芬的抗性。(Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells.) . 分子癌症治疗学 (Mol Cancer Ther.) 2002;1:707-717。

[0587] 33. 村冈-库克RS (Muraoka-Cook RS) 、信I (Shin I) 、维JV (Vi JV) 等人活化的I型TGF β 受体激酶增强乳腺上皮细胞的存活并加速肿瘤进展 (Activated type I TGFbeta receptor kinase enhances the survival of mammary epithelial cells and accelerates tumor progression) . 癌基因 (Oncogene) . 2006;25:3408-3423。

[0588] 34. 法尔乔尼R (Falcioni R) 、安东尼尼A (Antonini A) 、尼斯堤可P (Nistico P) 等人 $\alpha 6\beta 4$ 和 $\alpha 6\beta 1$ 整合素在人类癌细胞系中与ErbB-2结合 (Alpha 6beta 4 and alpha 6beta 1 integrins associate with ErbB-2 in human carcinoma cell lines) . 实验细胞研究 (Exp Cell Res.) 1997;236:76-85。

[0589] 35. 郭W (Guo W) 、皮雷尔伊娃Y (Pylayeva Y) 、佩佩A (Pepe A) 等人 $\beta 4$ 整合素放大ErB2信号传导以促进乳腺肿瘤 (Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis) . 细胞 (Cell) . 2006;126:489-502。

[0590] 36. 维奥莉特S (Violette S) 、谢泼德,D (Sheppard, D) 、罗萨斯,10 (Rosas, 10) 、阿乔曼迪,M (Arjomandi, M) 、赖斯,T (Rice, T) 、吉尔曼,M (Gilman, M) 、卡明斯基,N (Kaminski, N) 、普拉赛,A (Prasse, A) 、马罗尼,B (Maroni, B) . 用于在2A期特发性肺纤维化试验中监测STX-100 (一种人源化抗- $\alpha v\beta 6$ 抗体) 活性的生物标志物的鉴定 (Identification Of Biomarkers To Monitor The Activity Of STX-100, A Humanized Anti- $\alpha V\beta 6$ Antibody, In A Phase 2a Trial In Idiopathic Pulmonary Fibrosis) . 美国呼吸和危重病医学杂志 (Am J Respir Crit Care Med.) 2012;185。

[0591] 37. 本茨CC (Benz CC) 、斯科特GK (Scott GK) 、萨鲁普JC (Sarup JC) 等人,用HER2/neu转染的MCF-7细胞的雌激素依赖性、他莫昔芬耐药致瘤性生长 (Estrogen-dependent, tamoxifen resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu) . 乳腺癌研究与治疗 (Breast Cancer Res Treat.) 1992;24(2):85-95。

[0592] 38. 迈耶T (Meyer T) 、马歇尔JF (Marshall JF) 、哈特IR (Hart IR) . αv 整合素和玻连蛋白受体在乳腺癌细胞中的表达一致性 (Expression of alphav integrins and vitronectin receptor identity in breast cancer cells) . 英国癌症杂志 (Br J Cancer.) 1998;77(4):530-6。

[0593] 39. 桑特纳SJ (Santner SJ) 、道森PJ (Dawson PJ) 、泰特L (Tait L) 等人衍生自癌前人类乳腺上皮MCF10AT细胞的恶性MCF10CA1细胞系 (Malignant MCF10CA1 cell lines derived from premalignant human breast epithelial MCF10AT cells) . 乳腺癌研究与治疗 (Breast Cancer Res Treat.) 2001;65(2):101-10。

[0594] 40. 纳塔R(Nahta R)、埃斯特瓦FJ(Esteva FJ). 赫赛汀:作用和耐药机制(Herceptin:mechanisms of action and resistance). 癌症快讯(Cancer Lett.) 2006; 232(2):23-38。

[0595] 41. 尼夫RM(Neve RM)、秦K(Chin K)、弗里德兰J(Fridlyand J)等人用于研究功能不同的癌症亚型的乳腺癌细胞系集(A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes). 癌细胞(Cancer Cell). 2006; 10(6):515-27。

[0596] 42. 苏比克K(Subik K)、李JF(Lee JF)、巴克斯特L(Baxter L)等人通过免疫组化分析得到的ER、PR、HER2、CK5/6、EGFR、Ki-67和AR在乳腺癌细胞系中的表达模式(The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines). 乳腺癌(Auckl)(Breast Cancer (Auckl)). 2010;4:35-41。

[0597] 通过引用结合

[0598] 在此引用的所有参考文献(包括专利、专利申请、论文、教科书等)以及其中引用的所有参考文献出于所有目的通过引用以其全文而特此结合,达到它们未曾被引用的程度。

[0599] 等效形式

[0600] 前述书面说明书被认为足以使本领域的普通技术人员能够实践本发明实施例。前述说明书和实施例详述了某些实施例并且描述了由诸位发明人考虑到的最佳模式。然而,应理解的是无论上述内容多么详尽地以文本形式出现,实施例可以按许多方式来实践并且应该根据所附权利要求书及其任何等效形式加以解释。

序列表

<110> 米迪缪尼有限公司 (MedImmune Limited)

<120> 治疗和诊断过表达 α -V- β -6 的癌症的方法

<130> A5B6-101W01

<150> US 61/885, 302

<151> 2013-10-01

<160> 97

<170> PatentIn 3.4版

<210> 1

<211> 366

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tcgctggtgg ctccatcaga agtggtgatt actactggag ctggatccgc 120

cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggAACATCT attacagtgg gagcacctac 180

[0001] tacaaccgt ccctcaagag tcgaattacc atttcagtag ccacgtctag gaaccagttc 240

tccctgaagc tgacctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagaggg 300

ggagctatta cgattttgg agtgtttgac tactggggcc agggAACCTT ggtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

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

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

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

Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50

55

60

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

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

Cys Ala Arg Gly Gly Ala Ile Thr Ile Phe Gly Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

<210> 3
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 3
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtcttgc ctccagggga aagagccacc 60
 [0002] ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatacca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgtg cagtttggc 300
 caggggacca agctggagat caaa 324

<210> 4
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 4

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

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

<210> 5
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 5
 gaggtgcagc tgggggaggc ttggcacgc ctgggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttagc agctatgtca tgagctgggt ccgccaggct 120
 [0003] ccagggaaagg ggctggagtggtctcagct attagtgta gtggtggttag cacatactac 180
 gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agecgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggtgtg 300
 gatacagcta tggttaccta cggtatggac gtctgggccc aagggaccac ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 6
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 6

Glu Val Gln Leu Leu 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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser 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 Lys Gly Val Asp Thr Ala Met Val Thr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

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

<210> 7
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

[0004] <400> 7
tcctatgagc tgacacagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacaaac ggccaggatc 60
acctgctctg gagatgcatt gccaaaaaaa tatgcttatt ggtaccagca gaagtcaggc 120
caggccccctg tgctggcat ctatgacgac agcaaacgac cctccggat ccctgagaga 180
ttctctggct ccagctcagg gacaatggcc accttgacta tcagtgggc ccaggtggag 240
gatgaagctg actactactg ttactcaaca gacagcagtg gtaatcatag ggtgttcggc 300
ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 8
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr

35

40

45

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

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

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

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

<210> 9
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> 智人

[0005] <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (369)..(369)
 <223> n是a、c、g或t
 <400> 9
 gaggtgcagc tggcagtc tggcagag gtgaaaaagc cggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgttaagg gttctggata cagcttacc agtactgga tcggctgggt gcgcagatg 120
 cccggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgctct tccaaggcca ggtcatcctc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagacatgat 300
 gaaagtagtg gttattacta tgttttgat atctgggcc aaggacaat ggtcaccgtc 360
 tttcagcn 369

<210> 10
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 10

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

Gln Gly Gln Val Ile Leu Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Asp Glu Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Val Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

[0006]

<210> 11
<211> 327
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (300)..(300)
<223> n是c或t

<400> 11	
tcctatgagc tgacacaacc accctcggtg tcagtgtccc caggacaaac ggccaggatc	60
acctgctctg gagatgcatt gccaaaaaaa tatgcttatt ggtaccagca gaagtcaggc	120
caggccccctg ttctggtcat ctatgatgac atcaaacgac cctccggat ccctgagaga	180
ttctctggct ccagctcagg gacaatggcc accttgacta tcagtgggc ccaggtggag	240
gatgaagctg actactactg ttactcaaca gacagcagtg gtaatcattg ggttttcttn	300
ggcggaggga ccaagctgac cgtccta	327

<210> 12
<211> 109

<212> PRT
 <213> 智人

<400> 12

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

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

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

[0007]

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

<210> 13
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 13

caggtgcagc tggtgcatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggc 60

tcctgcaagg cttctggata cacattacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgatgt gatggatgg atcaacccta aaagtggta cacaaactat 180

gcacagaagt ttcaggccag ggtcaccctg accaggaca cgtccaccag cacagcctac 240

atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaaggttg 300

gacgtctggg gccaaggac cacggtcacc gtctcctca 339

<210> 14
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 14

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Lys Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
[0008] 100 105 110

Ser

<210> 15

<211> 330

<212> DNA

<213> 智人

<400> 15

cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcccc caggacagaa ggtcaccatc 60

tctgtctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120

ccaggaacag ccccaaact ctcatttat gacaataata agcgaccctc aggaattcct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tggcatcac cggactccag 240

actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatggaata gcagcctgag tgctggttat 300

gtcttcggaa ctgggaccaa ggtcaccgtc 330

<210> 16

<211> 110

<212> PRT
 <213> 智人

<400> 16

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80

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

[0009]

Ser Ala Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val
 100 105 110

<210> 17
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征
 <222> (375)..(375)
 <223> n是a、c、g或t

<400> 17

gaggtgcagtc	tggtgcatc	tggaggcagag	gtgaaaaagc	ccggggagtc	tctgaagatc	60
tcctgttaagg	gttctggata	cagctttacc	agctactgga	tcggctgggt	gcgccagatg	120
cccgaaaag	gcctggagtg	gatggggatc	atctatcctg	gtgactctga	taccagatat	180
agtccgtcct	tccaaggcca	ggtcaccatc	tcagccgaca	agtccatcag	caccgcctac	240
ctgcagtgga	gcagcctgaa	ggcctcggac	accgccccatgt	attactgtgc	gagacatgg	300
atagcagcag	ctggtttcta	ctactactat	atggacgtct	ggggccaagg	gaccacggc	360

accgtctcct cagcn

375

<210> 18
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 18

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

Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr
				20				25				30			

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

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

Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
[0010]				65		70			75				80		

Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85				90				95			

Ala	Arg	His	Gly	Ile	Ala	Ala	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Tyr	Met	Asp		
				100				105			110				

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

<210> 19
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (325)..(325)
 <223> n是a或c

<220>
 <221> 尚未归类的特征

<222>	(327)..(327)					
<223>	n是a、c、g或t					
<400>	19					
gaaatttgtt	tgacgcagtc	cccagacacc	ctgtctttgt	ctccaggggta	aagagcctcc	60
ctctcctgca	gggccagtc	aatgttaac	aggaactact	tagtctggta	ccagcagaaaa	120
cctggccagg	ctcccaggct	cctcatctat	ggtacatcca	acagggccac	tggcatccca	180
gacaggttca	gtggcagtgg	gtctgggaca	gacttcactc	tcaccatcag	cagactggag	240
cctgaagatt	ttgcagttt	ttactgtcag	cagtgtggta	gtttaccatt	cactttcgcc	300
cctggggacca	aagtggatat	caaangn				327

<210> 20
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 20

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

[0011] Glu Arg Ala Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val Asn Arg Asn
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Cys Gly Ser Leu Pro
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
100 105

〈210〉 21
〈211〉 372
〈212〉 DNA
〈213〉 智人

<400> 21
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtgtt actactggac ctggatccgc 120
cagcacccag ggaacggcct ggagtggatt ggctacatct attacagtgg gagcacctcc 180
tacaaccgt ccctaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaacagttc 240
tccctgaacc tgacctctgt gactgcccg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300
ggaccactac ggggggacta ctactacggt ctggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 22
<211> 124
<212> PRT
<213> 智人

<400> 22

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

[0012]

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

Val Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Asn Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Asn Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Pro Leu Arg Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp
100 105 110

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

<210> 27
<211> 339
<212> DNA
<213> 智人

- 〈220〉
- 〈221〉 尚未归类的特征
- 〈222〉 (312)..(312)
- 〈223〉 n是c或t

<400> 27 gatattgtga tgacccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60
atcttctgca agtctagtca gagcctcctg aacagtgtatg gaaagaccta tttgtttgg 120
tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctccgtatct atgaagttc caaccggttc 180
tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agccgggtgg aggctgagga ttttttttttattactgca tgcaaggat acagcttccg 300
tggcggttct tngccaagg gaccaaggtg gaaatcaaa 339

[0015] <210> 28
<211> 113
<212> PRT
<213> 智人

<400> 28

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

Gln Pro Ala Ser Ile Phe Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Ile Gln Leu Pro Trp Ala Phe Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 29
 <211> 383
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 29
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccgagga ctggtaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtggtt actactggag ctggatccgc 120
 cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagaacctac 180
 aacaaccgt ccctaagag tcgagttacc atatcaatcg acacgtctaa gaaccagtcc 240
 tccctgaagt tgagttctgt gactgccgac gacacggccg tgtattactg tgcgagatgt 300
 gctacgggaa gaggggacta ccattctac gctatggacg tctggggcca agggaccacg 360
 gtcaccgtct cctcagcctc cac 383

[0016] <210> 30
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 30

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Asn Asn Pro Ser
 50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Val Ala Thr Gly Arg Gly Asp Tyr His Phe Tyr Ala Met
100 105 110

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

<210> 31
<211> 318
<212> DNA
<213> 智人

<400> 31
tcctatgagc tgacacagcc atcctcagtgc tca gttgtctc cgggacagac agccaggatc 60
acctgctcag gagatgtact ggcaaaaaag tctgctcggt gttccacca gaagccaggc 120
caggcccctg tactggtgat ttataaagac agtgagcggc cctcagggat ccctgagcgc 180
ttctccggct ccagctcagg gaccacagtc accttgacca tcagcgggc ccaggtttag 240
[0017] gatgaggctg cctattactg ttactctgcg gctgacaaca atctggtatt cggcggaggg 300
accaagctga ccgtcccta 318

<210> 32
<211> 106
<212> PRT
<213> 智人

<400> 32

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

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

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

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

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

Asp Glu Ala Ala Tyr Tyr Cys Tyr Ser Ala Ala Asp Asn Asn Leu Val
85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 33

<211> 354

<212> DNA

<213> 智人

<400> 33

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggaggcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60

tccctgttaagg gttctggata cagcttccc agctactgga tcggctgggt gcgcaggatg 120

cccgaaaaagg gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180

agccccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagctgaca agtccatcag caccgcctac 240

ctgcagtggc gcagcctgaa gcgcctggac accgcctgtt attactgtgc gagacaccct 300

[0018] atggaggacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 34

<211> 118

<212> PRT

<213> 智人

<400> 34

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Ser Tyr
20 25 30

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Pro Met Glu Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 321
<212> DNA
<213> 智人

<400> 35
tcctatgagc tgacacagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacaaac ggccaggatc 60
acctgtctg gagatgcttt gccaaaaaaa tatgctttt ggtaccagca gaagtcaggc 120
caggccccctg tgctggcat ctatgacgac aacaaacgac cctccggat ccctgagaga 180
ttctctggct ccagctcagg gacaatggcc accttgacta tcactgggc ccaggtggag 240
[0019] gatgaagctg actactactg ttactcaaca gacagcagtg gtcatcatgt attcggcgg 300
gggaccaagc tgaccgtcct a 321

<210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 36

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
20 25 30

Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Ser 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

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

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

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

<210> 37

<211> 375

<212> DNA

<213> 智人

<400> 37

caggtgcagc tggtgaggc tgggggaggc gtggccagc ctgggaggc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg gtggaagtaa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

[0020] ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatctg 300

gcagctcgctc gggggacta ctactactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 38

<211> 125

<212> PRT

<213> 智人

<400> 38

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Leu Ala Ala Arg Arg Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

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

<210> 39

<211> 321

<212> DNA

<213> 智人

<400> 39

tcttctgagc tgactcagga ccctgttgt tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acttgccaag gcgcacagcct cagaagctat tatttaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggccccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

[0021] ttctctggct ccaactcagg aaacacagct tccttgacca tcactgggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taattcccg gacagcagt gtaaccatct gttcggcggaa 300

gggaccaagc tgaccgtcct a 321

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 40

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

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Leu
20 25 30

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

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

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

Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Ser	Arg	Asp	Ser	Ser	Gly	Asn	His
						85			90					95	

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

<210> 41

<211> 375

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (81)..(81)

<223> n是c或t

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (90)..(90)

[0022] <223> n是a、c、g或t

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (105)..(105)

<223> n是c或t

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (300)..(300)

<223> n是a、c、g或t

<400> 41

gaggtgcagc	tggtgagtc	tggggaggc	ctggtaagc	ctgggggtc	cctgagactc	60
------------	-----------	-----------	-----------	-----------	------------	----

tcctgtgcag	cctctggata	nacttcacn	aactatatca	tgcantgggt	ccgccaggct	120
------------	------------	-----------	------------	------------	------------	-----

ccagggaaagg	ggctggagtg	ggtctcatcc	attagtatta	gtagtagtta	cataatactac	180
-------------	------------	------------	------------	------------	-------------	-----

gcagactcag	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	acgccaagaa	ctcaactgtat	240
------------	------------	------------	------------	------------	-------------	-----

ctgcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagagatccn	300
------------	------------	------------	------------	------------	------------	-----

gtaccactgg	aacgacgcga	ctactactac	ggtatggacg	tctggggcca	agggaccacg	360
------------	------------	------------	------------	------------	------------	-----

gtcaccgtct	cctca					375
------------	-------	--	--	--	--	-----

<210> 42
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 42

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

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

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

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

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

[0023] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Pro Val Pro Leu Glu Arg Arg Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met
 100 105 110

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

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

<400> 43

cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcaatg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc	60
tcctgtctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc	120
ccaggaacag ccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct	180
gaccgattct ctggctcaa gtctggcacg tcagccaccc tggcatcac cgactccag	240
actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatggata gcagcctgag cgctgggta	300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta	330

<210> 44
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 44

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80

[0024] Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
 85 90 95

Ser Ala Gly Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 45
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 45

caggtgcagc tggtgagtc tgggggaggc gtggccagc ctggaggc cctgagactc	60
tccctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct	120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggatg atggaatgtaa taaatactac	180
gcagactccg tgaaggcccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgtt attactgtgc gagaacggag	300
ggtatagcag ctcgtctcta ctactactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg	360
gtcacccgtct cctca	375

<210> 46
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 46

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

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

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

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

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

[0025] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Thr Glu Gly Ile Ala Ala Arg Leu Tyr Tyr Tyr Gly Met
 100 105 110

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

<210> 47
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 47

gaaatttgtt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tgacatccca	180
gacaggttca gtggcagtgg gtctggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatggta gctcaccgtg gacgttcgcc	300

caagggacca aggtggaaat caaa

324

<210> 48
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 48

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

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

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

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

[0026] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro
													95		
85															

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

<210> 49
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 49

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1													15		

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr
													30		
20															

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Leu Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 50

<211> 123

<212> PRT

<213> 智人

<400> 50

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

[0027]

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Val Gln Leu Glu Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
100 105 110

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

<210> 51
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 51

Glu Val Gln Leu Leu 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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser 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

[0028] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Val Asp Thr Ala Met Val Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 52
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 52

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

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

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

35

40

45

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

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

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

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

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

<210> 53
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 智人

[0029]

<400> 53

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Gly Ile Ala Ala Ala Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
 100 105 110

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

<210> 54
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

[0030]

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

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

Cys Ala Arg Ile Thr Ile Phe Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 55
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 55

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

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

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

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

[0031]

<210> 56
<211> 121
<212> PRT
<213> 智人

<400> 56

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg Leu Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 57
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 57

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

[0032] Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Ser Gly Tyr Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 58
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 58

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 100 105 110

[0033]

Ser

<210> 59
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 59

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 60
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 60

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

[0034] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
 85 90 95

Ile Gln Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 61
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 61

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0035] 100 105

<210> 62

<211> 108

<212> PRT

<213> 智人

<400> 62

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

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

<210> 63
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 63

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

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

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

[0036] Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
100 105

<210> 64
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 64

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn

20

25

30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80

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

Ser Ala Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val
 100 105

<210> 65
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 智人

[0037] <400> 65

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80

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

Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 66
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 66

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

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

[0038]

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

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

<210> 67
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 67

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 68
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 68

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

[0039] Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

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

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

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
85 90 95

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

<210> 69
<211> 106
<212> PRT
<213> 智人

<400> 69

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

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

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

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

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

Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Tyr	Ser	Ala	Ala	Asp	Asn	Asn	Val	Val
	85				90						95				

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

<210> 70

<211> 372

<212> DNA

<213> 智人

<400> 70

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtttt actactggac ctggatccgc 120

cagcacccag ggaacggcct ggagtggatt ggctacatct attacagtgg gagcacctcc 180

tacaaccgt ccctaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaacagttc 240

tccctgaagc tgacctctgt gactgccgac gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300

ggaccactac gggggacta ctactacggt ctggacgtct gggccaagg gaccacggtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 71

<211> 124

<212> PRT

<213> 智人

<400> 71

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

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

Val Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Asn Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Glu Gly Pro Leu Arg Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp
100 105 110

[0041]

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

<210> 72

<211> 324

<212> DNA

<213> 智人

<400> 72

gaaatttgtt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtcttgtt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccggta gactattagc agtcgtact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggcc cctcatctat ggtgcatacca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgttag cagtatggta gctcacctcg gacgttcggc 300

caagggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 73

<211> 108

<212> PRT

<213> 智人

<400> 73

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

[0042]

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

<210> 74

<211> 375

<212> DNA

<213> 智人

<400> 74

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccgagga ctggtaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtggtt actactggag ctggatccgc 120

cagcacccag ggaaggccct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagaacctac 180

aacaaccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagtcc 240

tccctgaagt tgagttctgt gactgcccg gacacggccg tgtattactg tgcgagagtg 300

gctacgggga gagcggacta ccacttctac gctatggacg tctggggcca agggaccacg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 75

<211> 125

<212> PRT

<213> 智人

<400> 75

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Asn Asn Pro Ser
50 55 60

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

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

[0043] Cys Ala Arg Val Ala Thr Gly Arg Ala Asp Tyr His Phe Tyr Ala Met
100 105 110

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

<210> 76

<211> 318

<212> DNA

<213> 智人

<400> 76

tcctatgagc tgacacagcc atcctcagtg tcaagtgtctc cgggacagac agccaggatc 60

acctgctcag gagatgtact ggcaaaaaag tctgctcggt ggttccacca gaagccaggc 120

caggccccctg tactggtgat ttataaagac agtgagcggc cctcagggat ccctgagcgc 180

ttctccggct ccagctcagg gaccacagtc accttgacca tcagcgggc ccaggtttag 240

gatgaggctg cctattactg ttactctgctg gctgacaaca atctggatt cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccctaa 318

<210> 77

<211> 106
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 77

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

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

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

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

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

Asp Glu Ala Ala Tyr Tyr Cys Tyr Ser Ala Ala Asp Asn Asn Leu Val
 [0044] 85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 78
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 78
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgcacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta aaagtggta cacaaactat 180
 gcacagaagt ttcaggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccaccag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaaggttg 300
 gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc gtctcctca 339

<210> 79
 <211> 113
 <212> PRT

<213> 智人

<400> 79

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Lys Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

[0045] Ala Arg Arg Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 80

<211> 333

<212> DNA

<213> 智人

<400> 80

cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60

tctcgctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120

ccaggaacag ccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc aggaattcct 180

gaccgattct ctggctcaa gtctggcacg tcagccaccc tggcatcac cggactccag 240

actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatggaata gcagcctgag tgctggttat 300

gtcttcggaa ctgggaccaa ggtcaccgtc cta 333

<210> 81

<211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 81

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80

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

[0046]

Ser Ala Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 82
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 82

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggc 60

tcctgcagg cttctggata cacccacc ggctactata tgcactgggt gcgcacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatggatgg atcaacccta aaagtggta cacaaactat 180

gcacagaagt ttcaggcag ggtcaccctg accaggaca cgtccaccag cacagcctac 240

atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaaggttg 300

gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc gtctcctca 339

<210> 83

<211> 113

<212> PRT

<213> 智人

<400> 83

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Lys Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

[0047] Ala Arg Arg Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 84

<211> 333

<212> DNA

<213> 智人

<400> 84

cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60

tccctgctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120

ccaggaacag ccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc aggaattcct 180

gaccgattct ctggctcaa gtctggcacg tcagccaccc tggcatcac cggactccag 240

actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatggata gcagcctgag tgctggttat 300

gtcttcggaa ctgggaccaa ggtcaccgtc cta 333

<210> 85

<211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 85

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80

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

[0048]

Ser Ala Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 86
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 86

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggc 60

tcctgcagg cttctggata cacccacc ggctactata tgcactgggt gcgcacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatggatgg atcaacccta aaagtggta cacaaactat 180

gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccaccag cacagcctac 240

atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaaggttg 300

gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc gtctcctca 339

<210> 87

<211> 113

<212> PRT

<213> 智人

<400> 87

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Lys Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

[0049] Ala Arg Arg Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 88

<211> 333

<212> DNA

<213> 智人

<400> 88

cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60

tctcgctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120

ccaggaacag ccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc aggaattcct 180

gaccgattct ctggctcaa gtctggcacg tcagccaccc tggcatcac cggactccag 240

actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatggata gcagcctgag tgctggttat 300

gtcttcggaa ctgggaccaa ggtcaccgtc cta 333

<210> 89

<211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 89

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
 [0050] 85 90 95

Ser Ala Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 90
 <211> 383
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 90

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtggtt actactggag ctggatccgc 120

cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagaacctac 180

aacaaccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgaagt tgagttctgt gactgccgac gacacggccg tgtattactg tgcgagagtg 300

gctacgggga gaggggacta ccacttctac gctatggacg tctggggcca agggaccacg 360

gtcaccgtct cctcagcctc cac 383

<210> 91

<211> 125
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 91

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Asn Asn Pro Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 [0051] 85 90 95

Cys Ala Arg Val Ala Thr Gly Arg Gly Asp Tyr His Phe Tyr Ala Met
 100 105 110

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

<210> 92
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 92

tcctatgagc tgacacagcc atcctcagtg tca	gtgtctc cggcacagac agccaggat	60
acctgctcag gagatgtact ggcaaaaaag tctgctcggt ggttccacca gaagccaggc		120
caggcccctg tactggtgat ttataaagac agtgagcggc cctcagggat ccctgagcgc		180
ttctccggct ccagctcagg gaccacagtc accttgacca tcagcgggc ccaggtttag		240
gatgaggctg actattactg ttactctgcg gctgacaaca atctggatt cggcggagg		300
accaagctga ccgtccata		318

<210> 93
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 93

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

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

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

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

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

[0052] Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Ala Ala Asp Asn Asn Leu Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 94
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 94

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccgagga ctggtaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtggtt actactggag ctggatccgc 120

cagcacccag ggaaggccct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagaacctac 180

aacaaccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagtcc 240

tccctgaagt tgagttctgt gactgccgac gacacggccg tgtattactg tgcgagagtg 300

gctacgggga gagcggacta ccacttctac gctatggacg tctggggcca agggaccacg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 95
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 95

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Asn Asn Pro Ser
 50 55 60

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

[0053] Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Val Ala Thr Gly Arg Ala Asp Tyr His Phe Tyr Ala Met
 100 105 110

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

<210> 96
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 96

tcctatgagc tgacacagcc atcctcagtg tcagtgtctc cgggacagac agccaggatc	60
acctgctcag gagatgtact ggcaaaaaag tctgctcggt ggttccacca gaagccaggc	120
caggccccctg tactggtgat ttataaagac agtgagcggc cctcagggat ccctgagcgc	180
ttctccggct ccagctcagg gaccacagtc accttgacca tcagcggggc ccaggttgag	240
gatgaggctg actattactg ttactctgctg gctgacaaca atctggatt cggcggaggg	300

accaagctga ccgtccata

318

<210> 97
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 97

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

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

[0054] Arg Trp Phe His Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

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

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

Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Tyr	Ser	Ala	Ala	Asp	Asn	Asn	Leu	Val
								85		90		95			

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

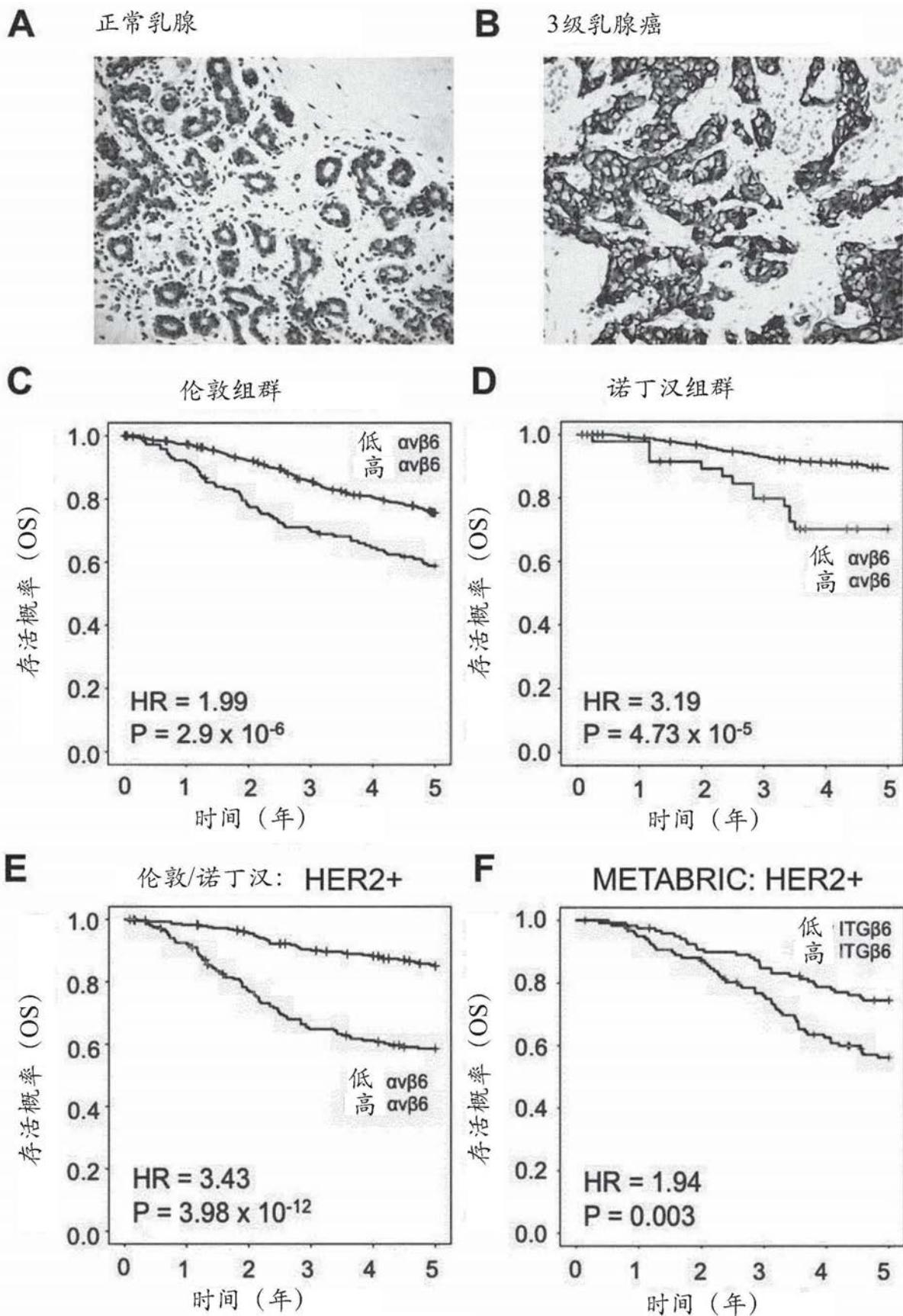


图1

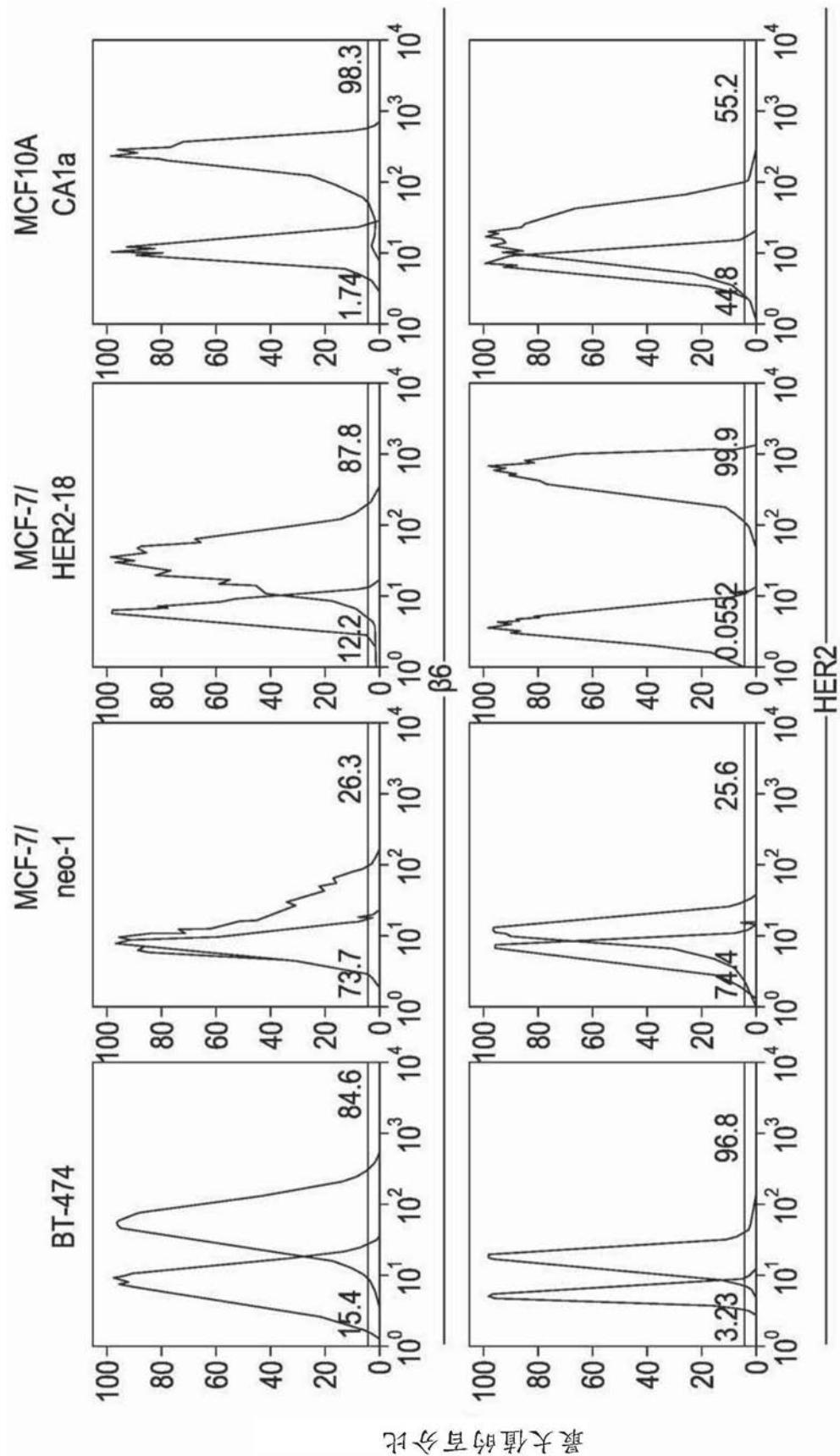


图2A

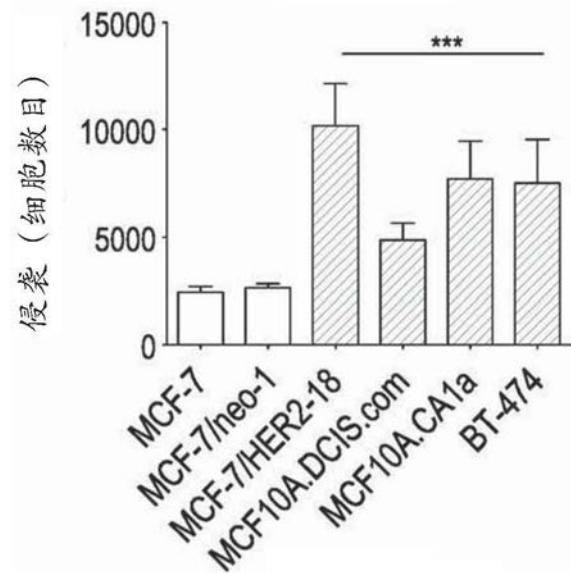


图2B

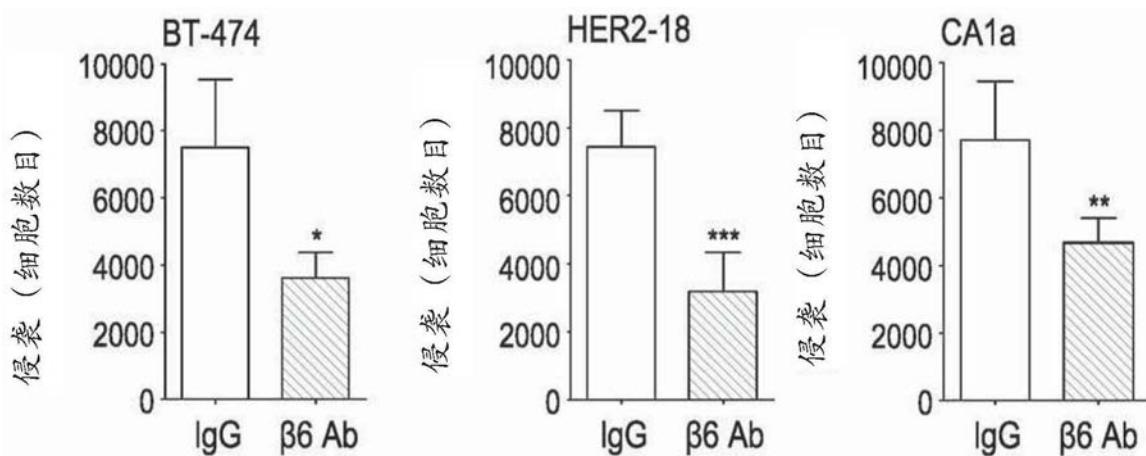


图2C

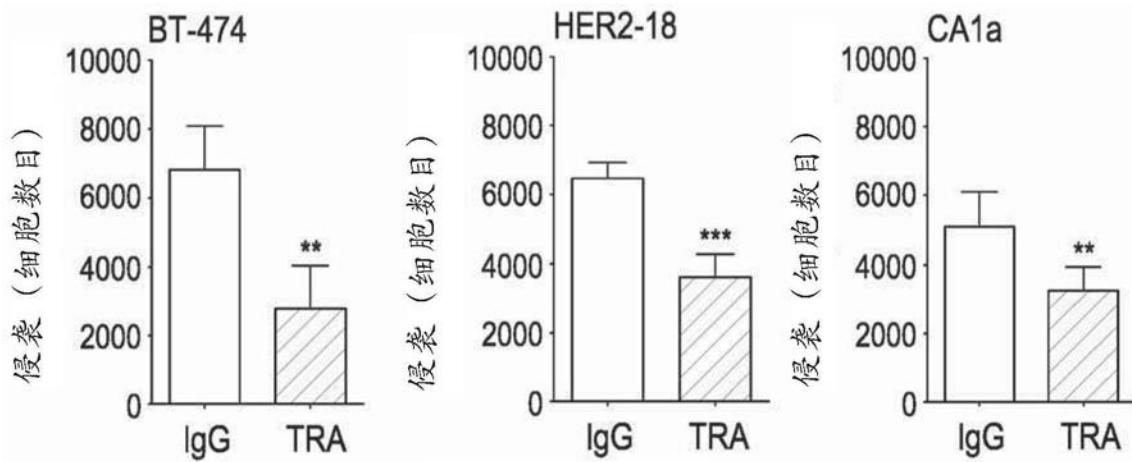


图2D

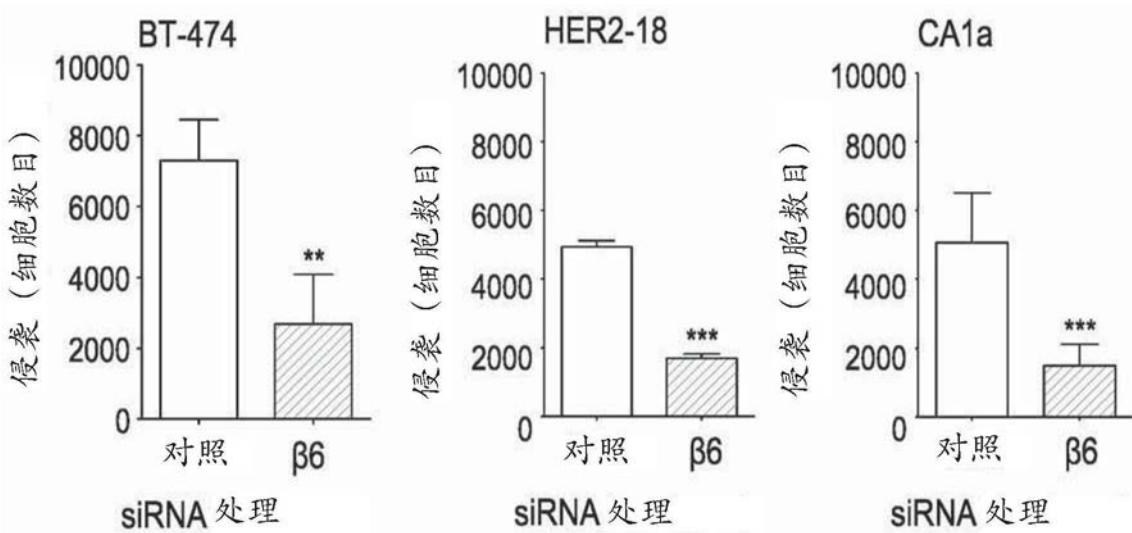


图2E

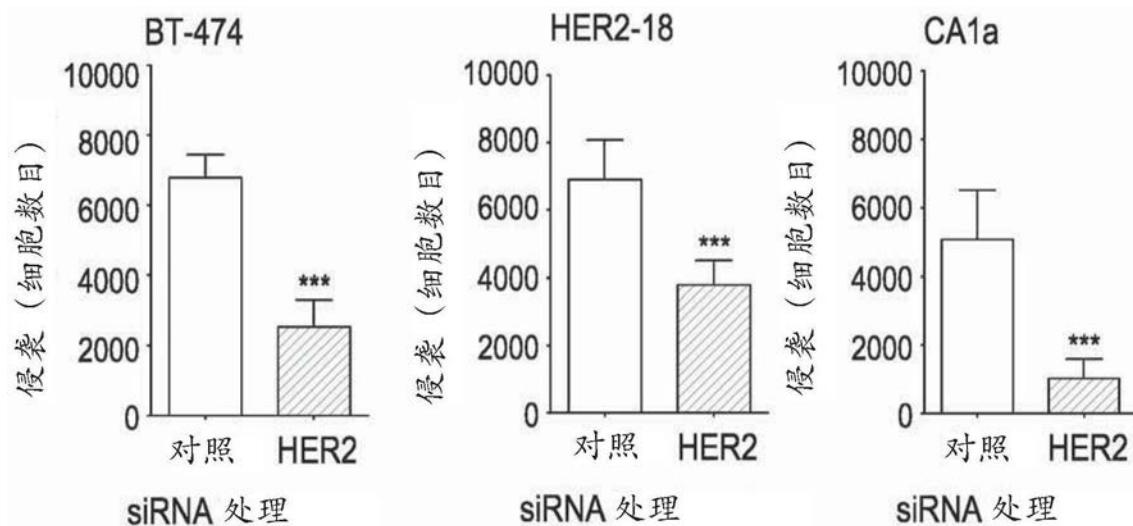


图2F

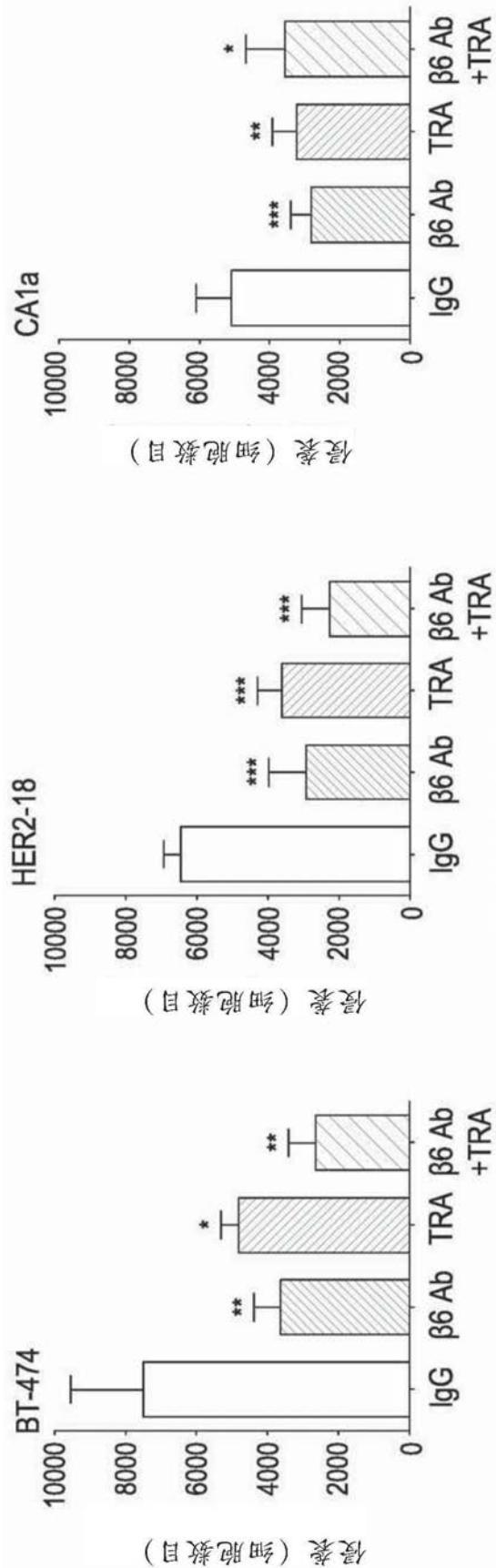


图2G

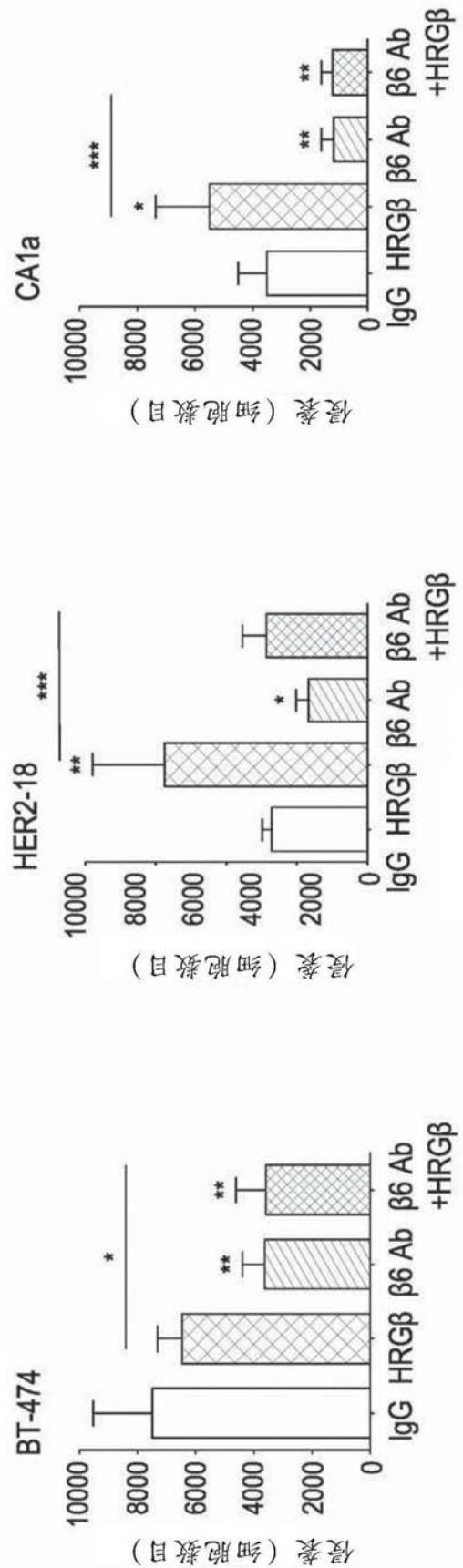


图3A

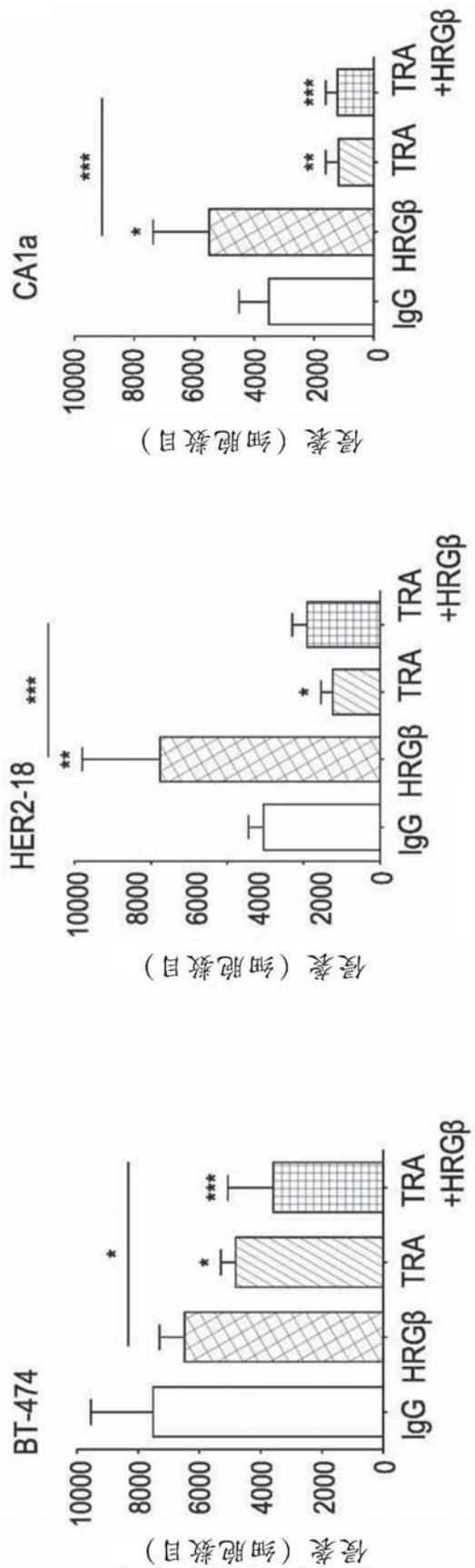


图3B

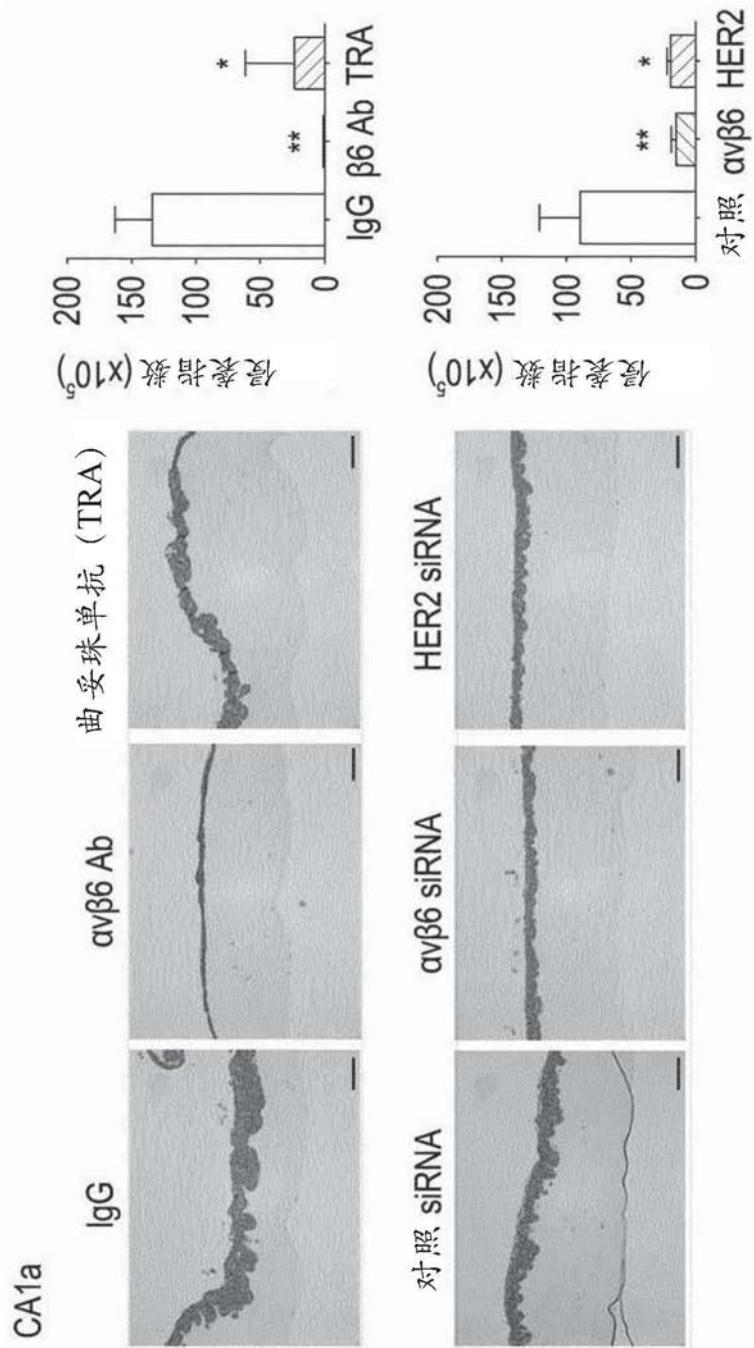


图3C

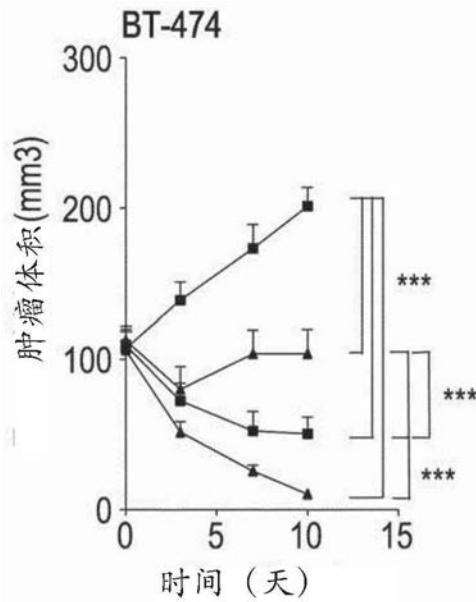


图4A

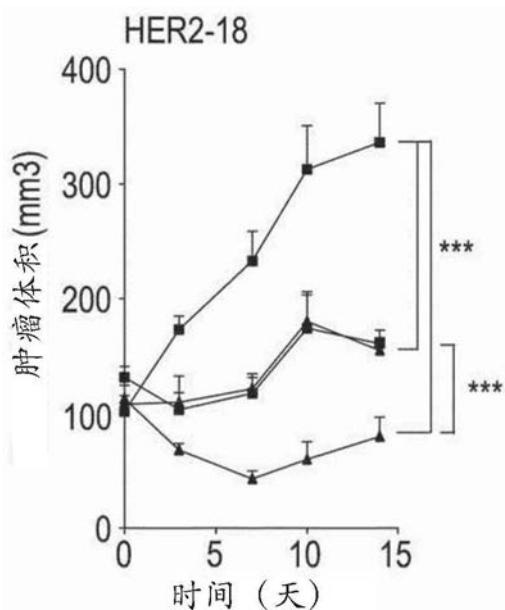


图4B

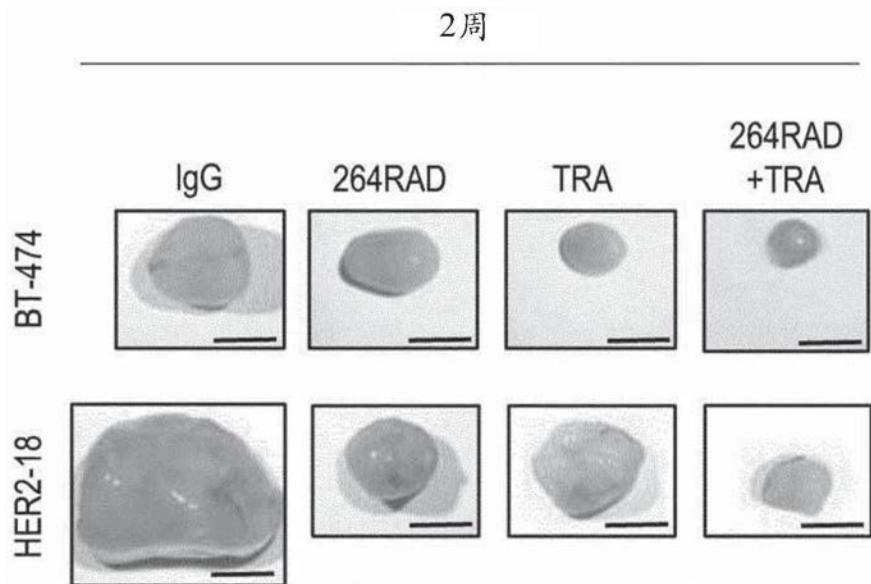


图4C

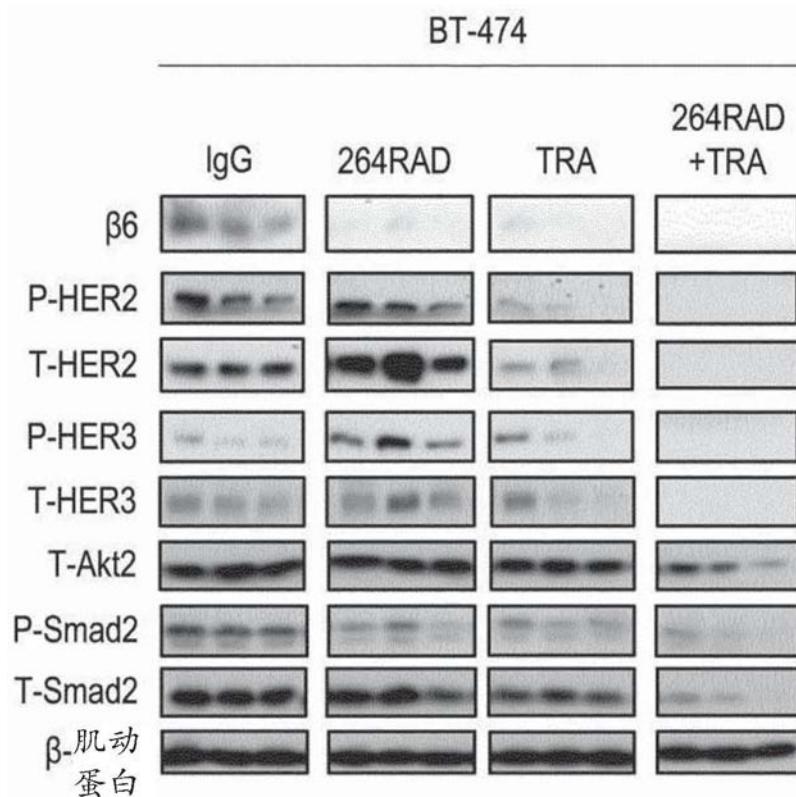


图4D

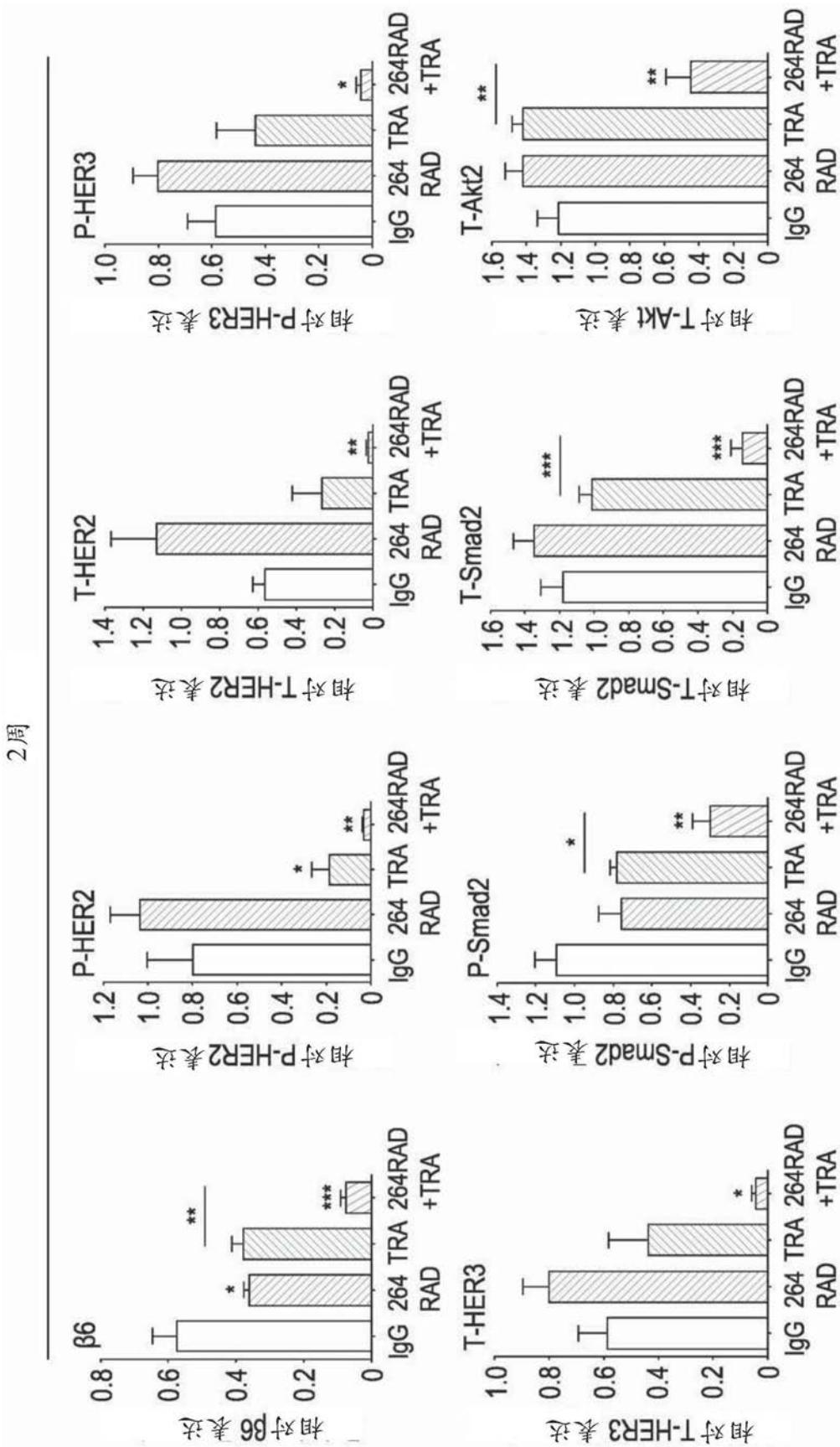


图4E

HER2-18

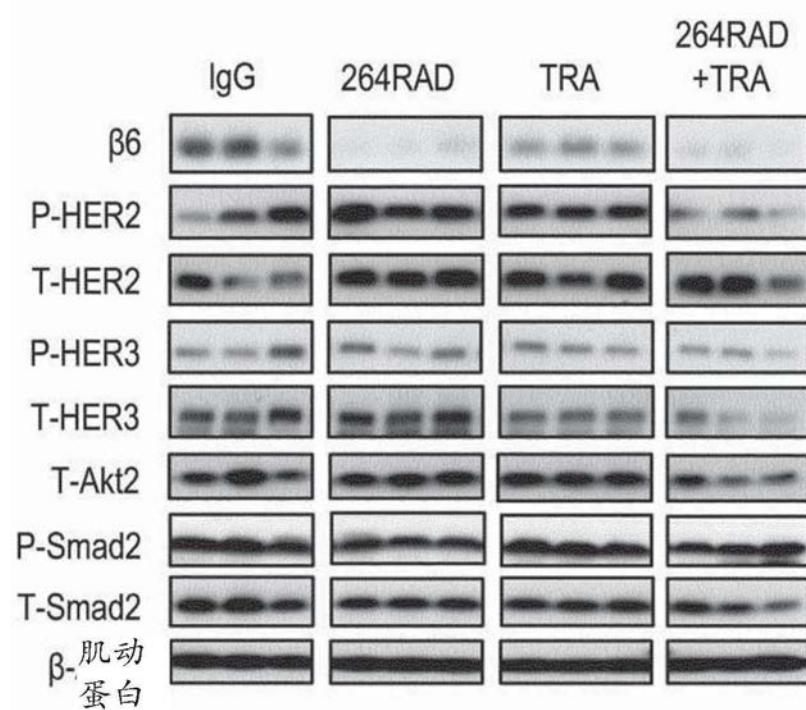


图4F

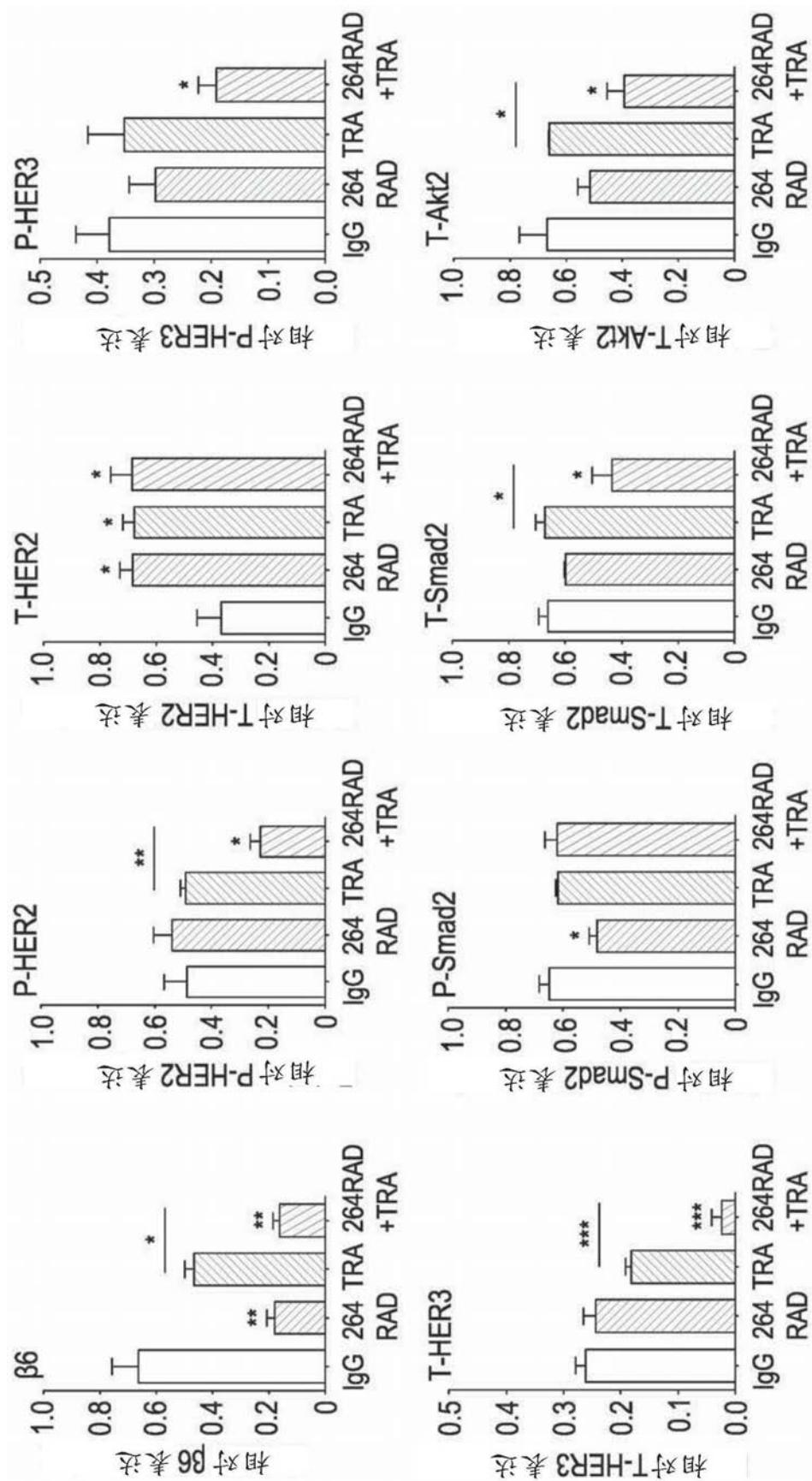


图4G

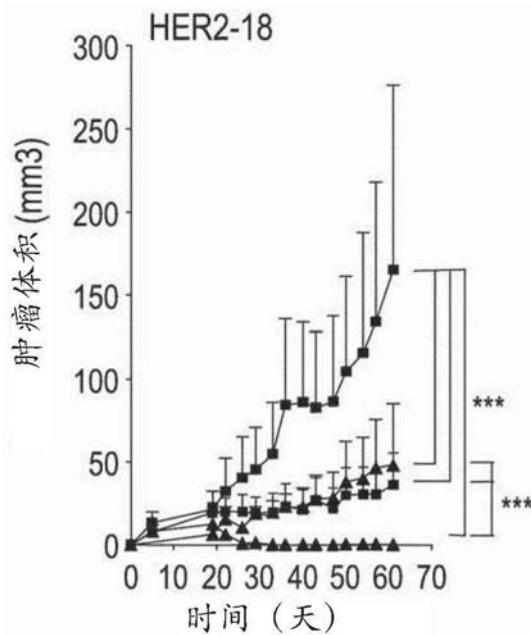


图5A

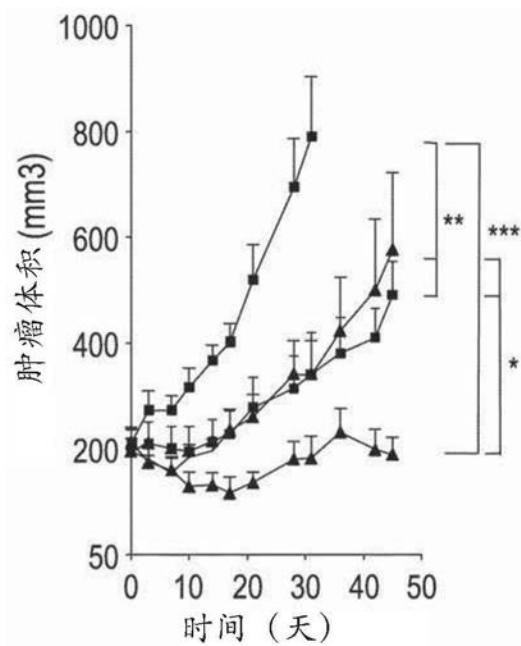


图5B

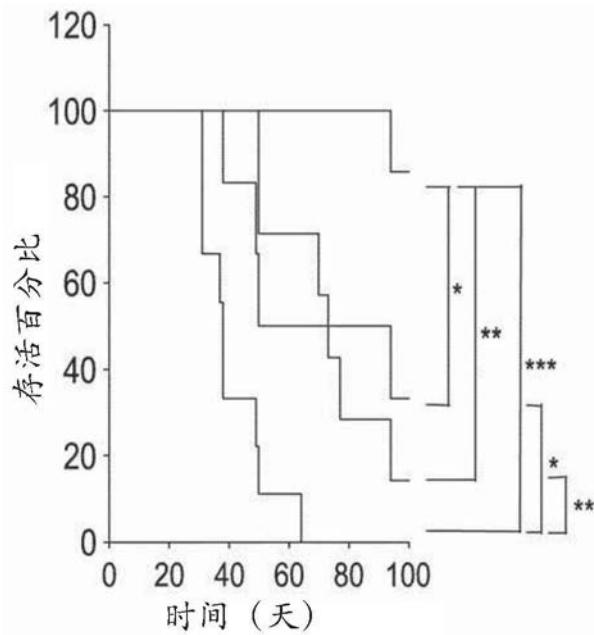


图5C

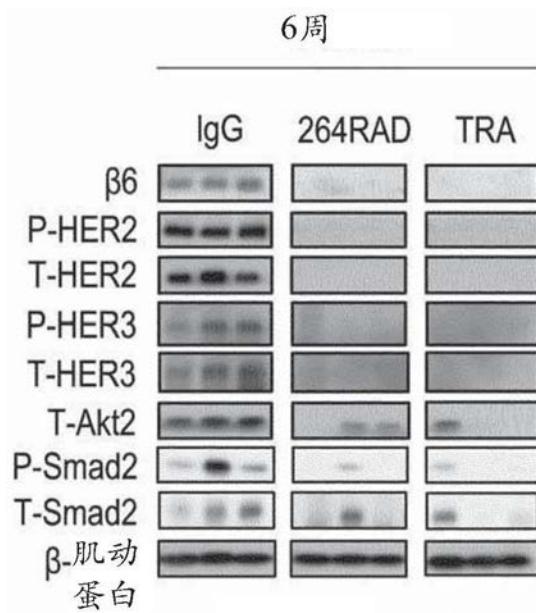


图5D

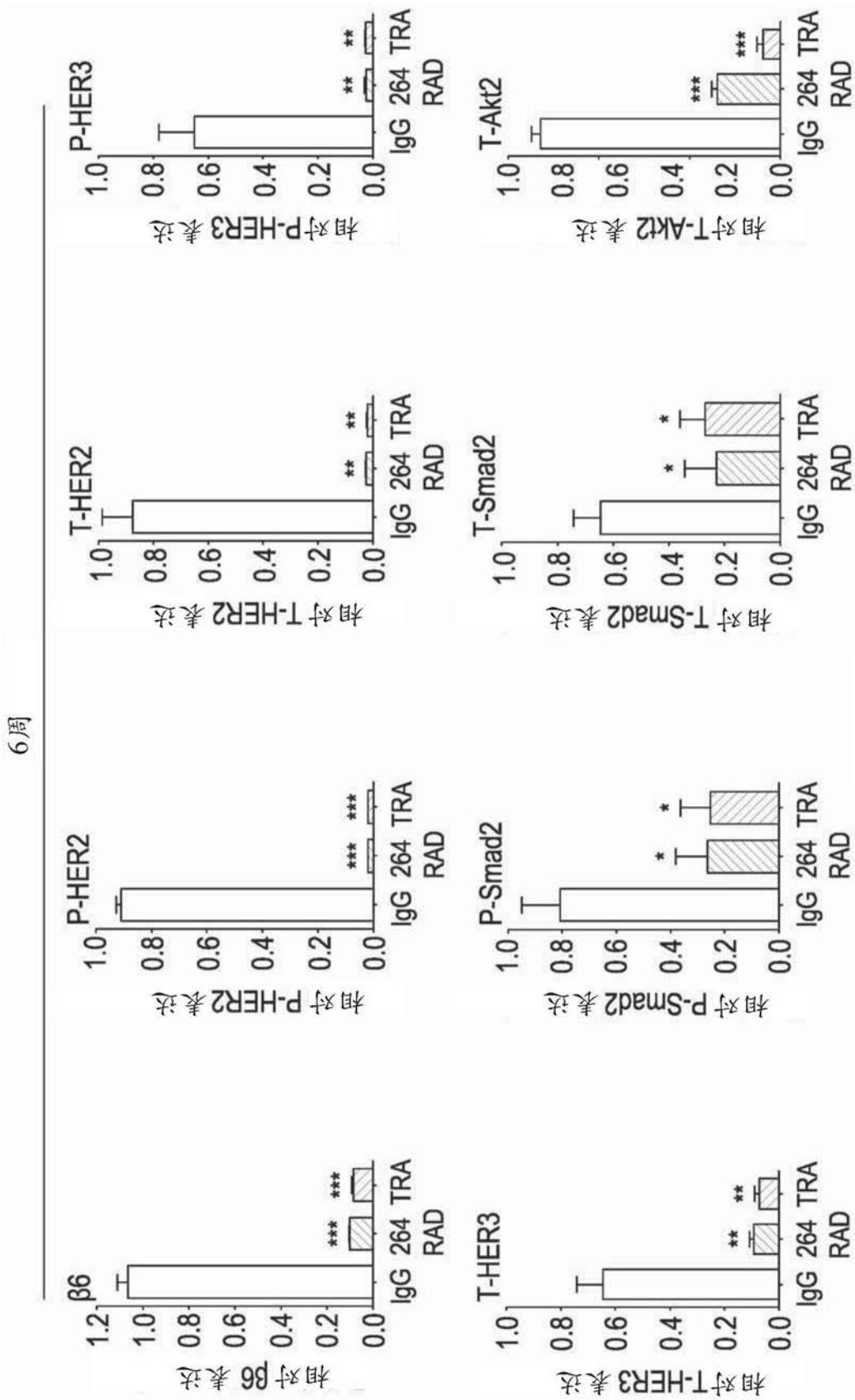
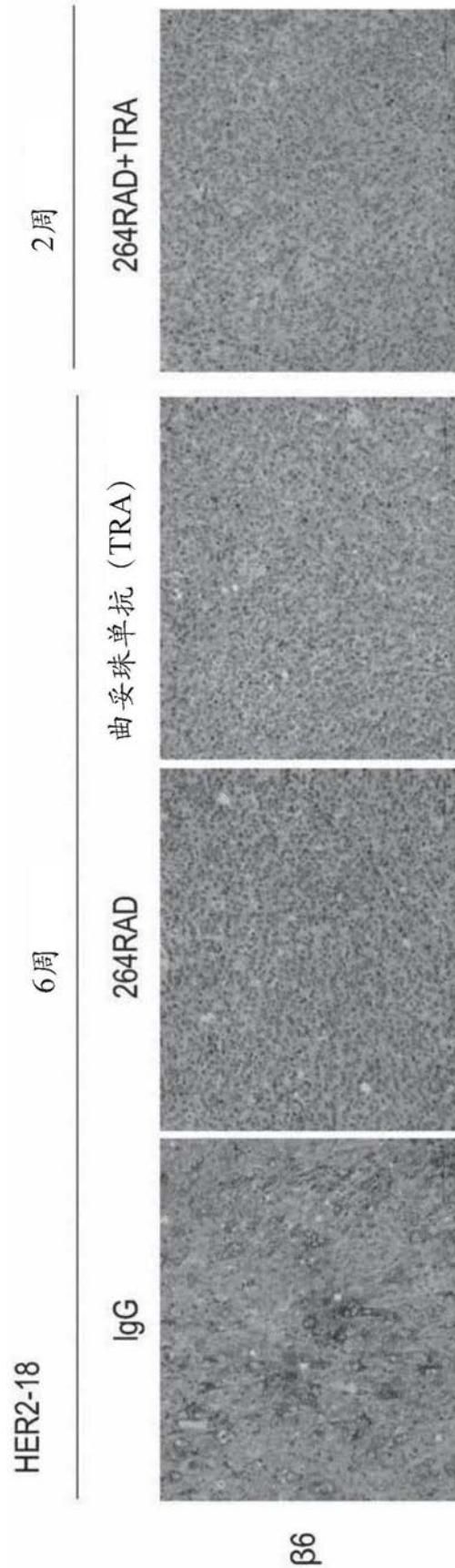


图5E



β 6

图5F

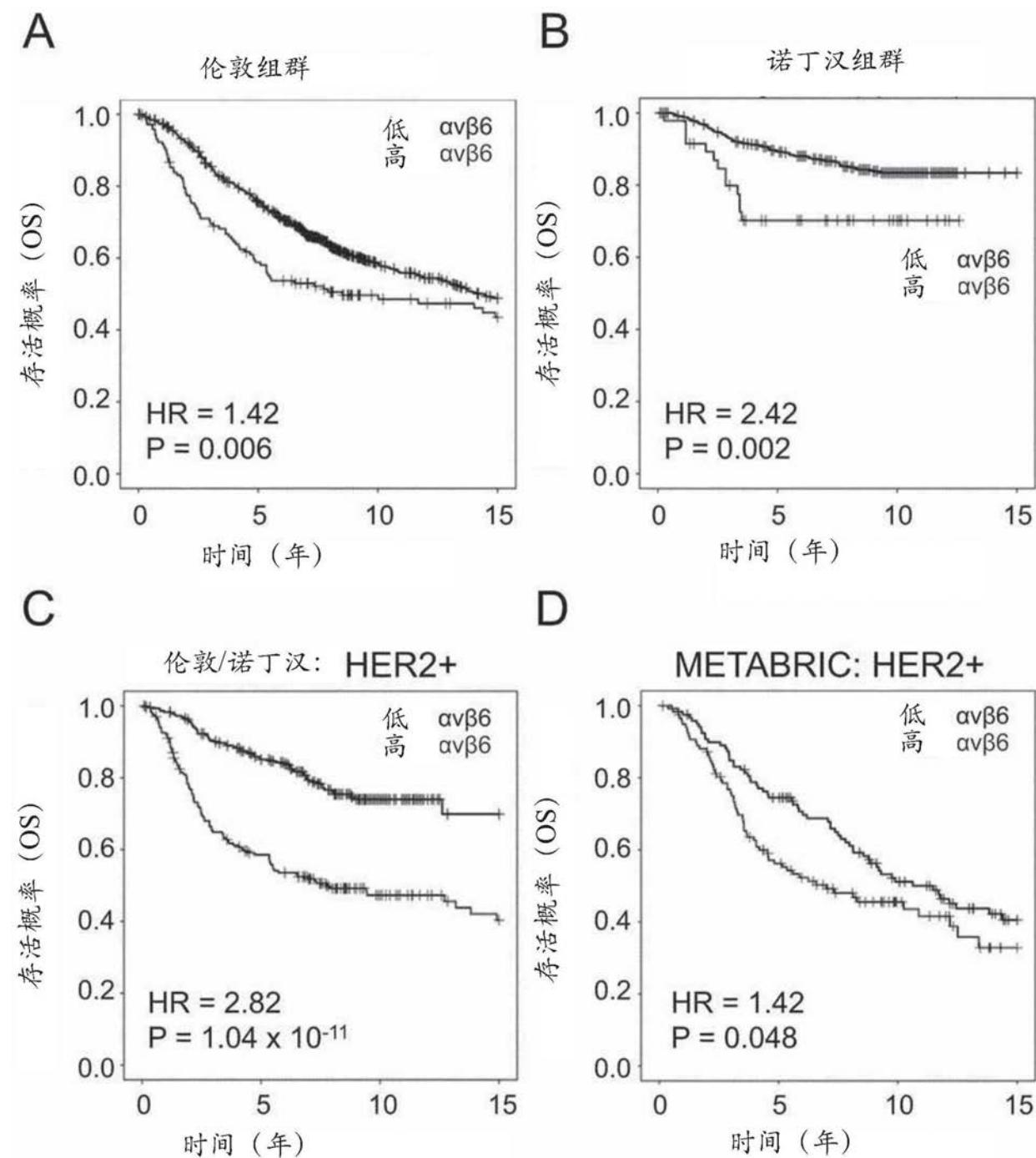


图6

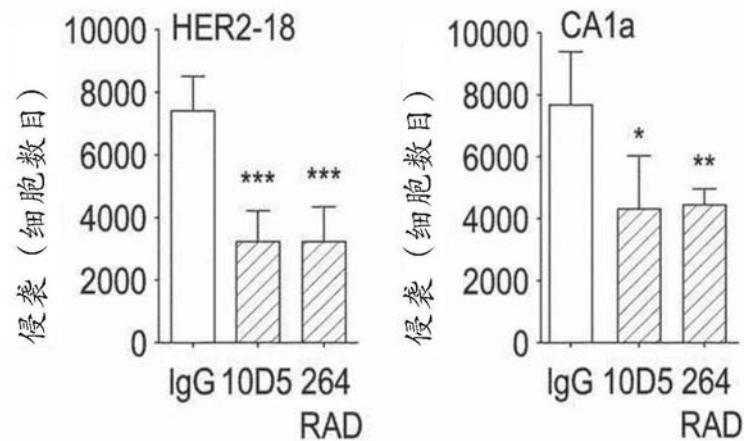


图 7A

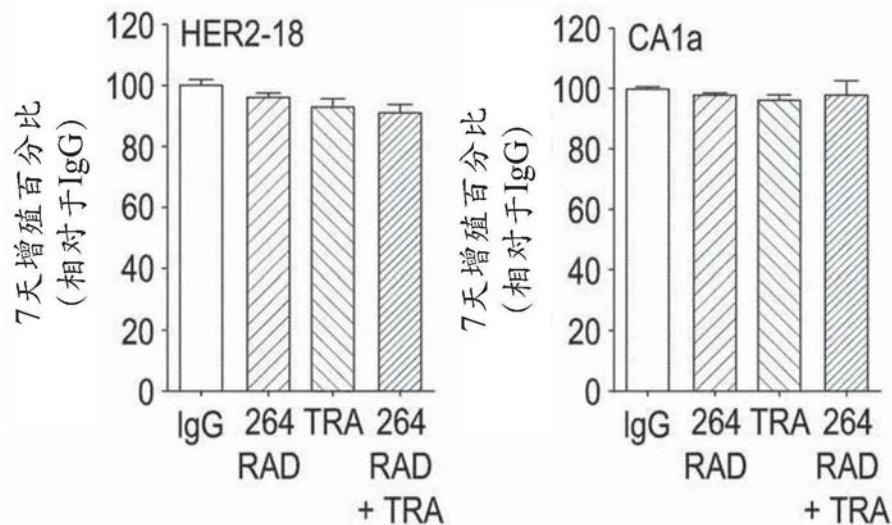


图 7B

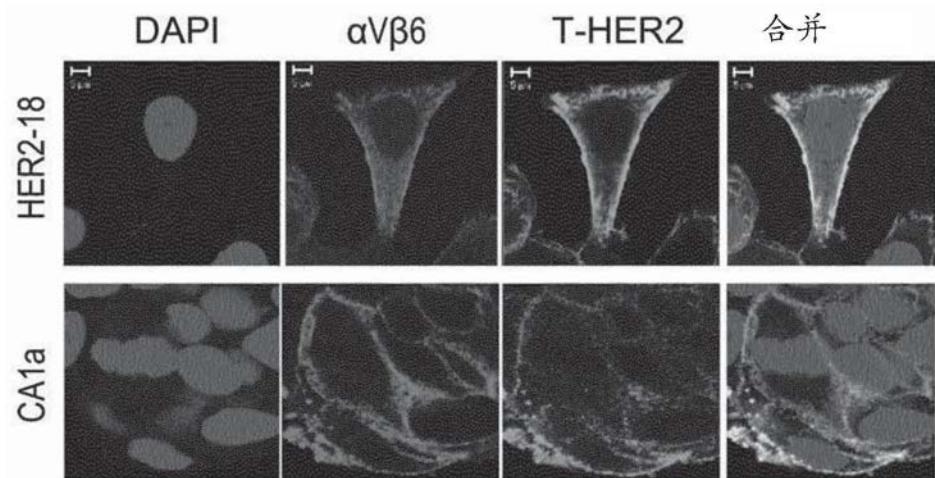


图7C

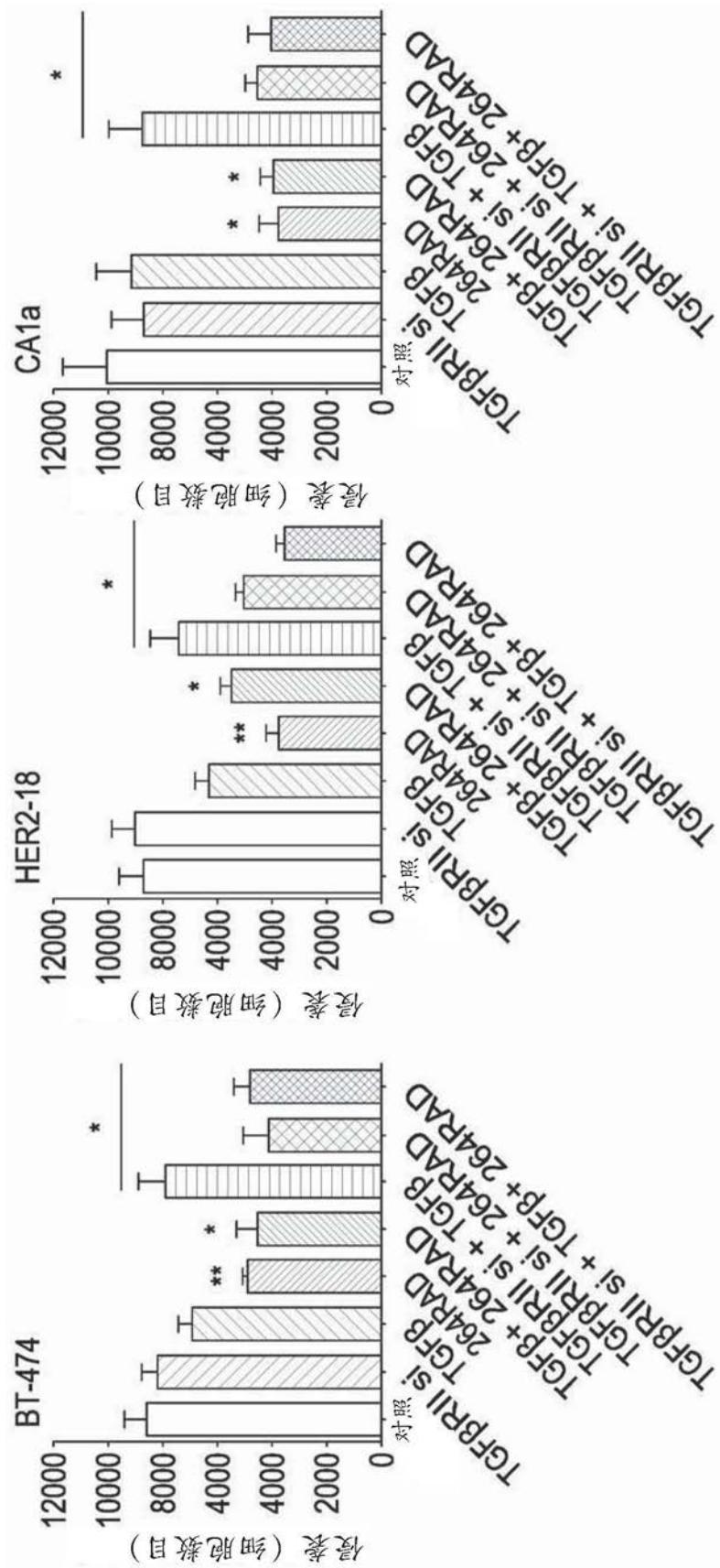


图8

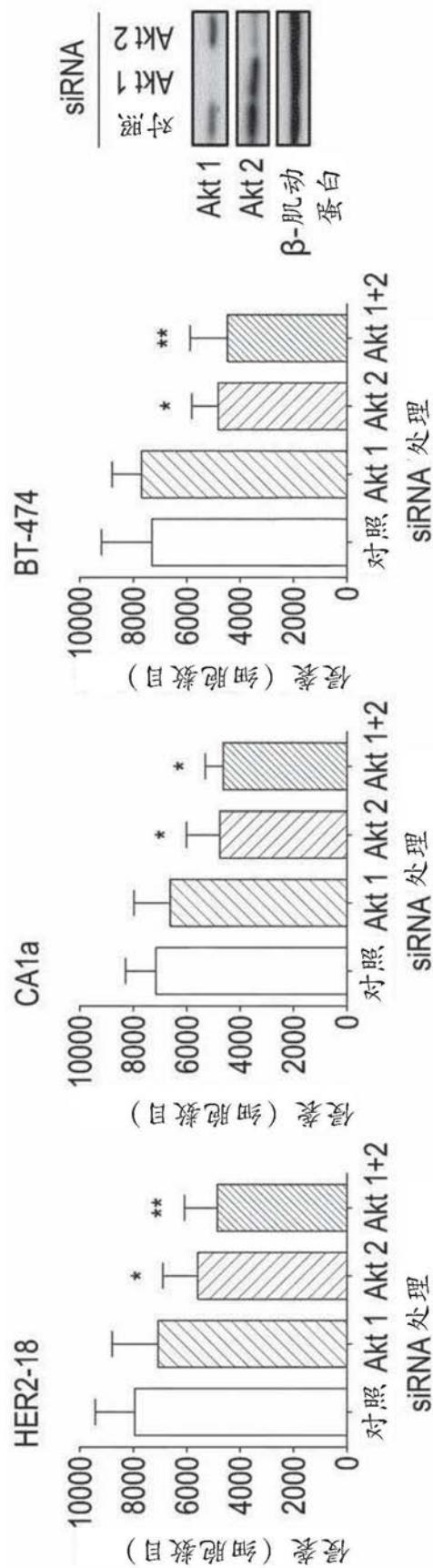


图9A

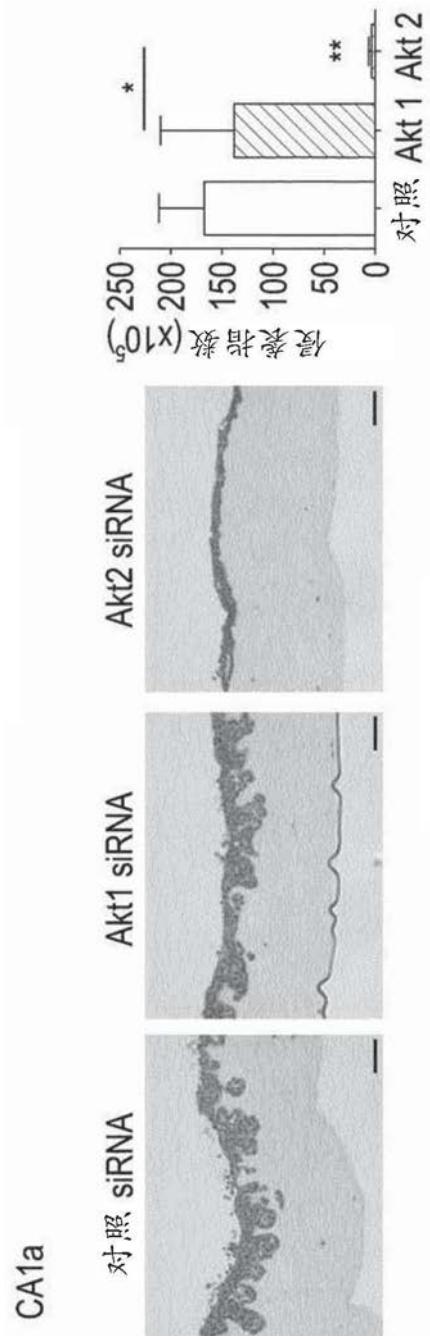


图9B

乳腺癌组织微阵列的诺丁汉和伦敦组群的临床病理学特征					
因素	分类	病例 (具有信息的总病例的%)	乳腺癌死亡 (病例的%)	病例 (具有信息的总病例的%)	乳腺癌死亡 (病例的%)
	诺丁汉组群			伦敦组群	
年龄 (岁)	≤40	157 (9)	54 (34)	110 (10)	58 (53)
	41-50	501 (28)	133 (27)	248 (22)	92 (37)
	51-60	591 (33)	154 (26)	304 (27)	144 (47)
	61-70	528 (29)	139 (26)	278 (24)	135 (49)
	70+	14 (1)	4 (29)	190 (17)	88 (46)
	未知	4	0	0	0
肿瘤尺寸 (mm)	≤10	218 (12)	26 (11)	108 (10)	20 (9)
	11-20	905 (51)	220 (24)	213 (19)	74 (35)
	21-30	483 (27)	164 (34)	235 (22)	85 (36)
	31-50	146 (8)	69 (47)	360 (33)	193 (54)
	>50	30 (2)	0 (0)	177 (16)	125 (71)
	未知	13	2	37	20
结状态	阴性	987 (63)	175 (18)	440 (52)	117 (27)
	阳性	581 (37)	215 (37)	403 (48)	189 (47)
	未知	227	94	287	211
分级	1	330 (19)	32 (10)	151 (14)	30 (20)
	2	595 (33)	125 (21)	484 (45)	220 (45)
	3	857 (48)	325 (38)	451 (41)	234 (52)
	未知	13	2	44	33
ER 状态	阴性	481 (29)	165 (34)	307 (32)	164 (53)
	阳性	1167 (71)	285 (24)	661 (68)	301 (46)
	未知	147	34	162	52
PR 状态	阴性	735 (45)	246 (33)	484 (50)	265 (55)
	阳性	896 (55)	201 (22)	484 (50)	197 (41)
	未知	164	484	162	55
αvβ6 状态	阴性/中	1034 (83)	277 (27)	817 (85)	393 (48)
	强	207 (17)	74 (36)	142 (15)	79 (56)
	未知	554	133	238	77
三阴性	否	1256 (79)	321 (26)	719 (80)	342 (48)
	是	331 (21)	113 (34)	175 (20)	99 (57)
	未知	208	50	303	108

图10

因素	分类	$\alpha v\beta 6$		显著性
		-ve/中	(%)	
诺丁汉系列				
肿瘤尺寸 (mm)	≤ 20	642 (63)	116 (57)	$p=0\cdot1$
	>20	384 (37)	89 (43)	
结状态	阴性	549 (62)	103 (58)	$p=0\cdot4$
	阳性	341 (38)	74 (42)	
分级	1	185 (18)	33 (16)	$p=0\cdot006$
	2	361 (35)	52 (25)	
	3	480 (47)	120 (59)	
ER 状态	阴性	241 (25)	87 (46)	$p<0\cdot001$
	阳性	713 (75)	102 (54)	
PR 状态	阴性	397 (42)	113 (60)	$p<0\cdot001$
	阳性	553 (58)	76 (40)	
HER2 状态	阴性	931 (92)	160 (78)	$p<0\cdot001$
	阳性	81 (8)	46 (22)	
三阴性/基底	阴性	750 (81)	138 (75)	$p=0\cdot05$
	阳性	176 (19)	47 (25)	
伦敦系列				
肿瘤尺寸 (mm)	≤ 20	226 (29)	28 (21)	$p=0\cdot06$
	>20	567 (71)	107 (79)	
结状态	阴性	312 (52)	51 (52)	$p=0\cdot9$
	阳性	290 (48)	47 (48)	
分级	1	95 (12)	3 (2)	$p<0\cdot001$
	2	407 (51)	57 (41)	
	3	289 (37)	80 (57)	
ER 状态	阴性	196 (26)	80 (63)	$p<0\cdot001$
	阳性	545 (74)	48 (37)	
PR 状态	阴性	330 (45)	106 (83)	$p<0\cdot001$
	阳性	406 (55)	21 (17)	
HER2 状态	阴性	671 (92)	81 (63)	$p<0\cdot001$
	阳性	55 (8)	48 (37)	
三阴性/基 底	阴性	581 (83)	86 (68)	$p<0\cdot001$
	阳性	121 (17)	40 (32)	

图11

分子亚型 ¹		细胞系	报告子状态	侵袭倾向 ²	表达 ³	
					αvB6	HER2
正常乳腺上皮		MCF10A		-	++++	-
基底 A	BT-20	TN	++	++++	-	
	HCC1937	TN	ND	++++	-	
	HCC1954	ER-, PR-, HER2+	+++	++++	+++	
	MDA MB-468	TN	++++	++++	-	
基底 B	HCC38	TN	++	++++	-	
	HS578T	TN	++	-	-	
	MCF10AT1k.c12	ER+	ND	++++	-	
	MCF10A.neo.T	ER+,	+	++++	-	
	MCF10A.CA1a	ER+	++++	++++	+++	
	MCF10A.CA1h	ER+,	ND	++++	-	
	MCF10A.DCIS.com	ER+	++++	++++	+++	
	SUM159	ER-, PR-	+++	++++	-	
	GI-101	ER+	++++	++++	-	
管腔	BT-474	ER+, PR+, HER2+	+++	++++	++++	
	MCF-7	ER+, PR+	-	-	+	
	MCF-7/neo-1	ER+, PR+	-	-	+	
	MCF-7/HER2-18	ER+, PR+, HER2+	++++	++++	++++	
	SKBR-3	ER-, PR-	ND	++++	++++	
	ZR-75	ER+, PR+	ND	-	++	

图12

靶标	抗体名称/目录号	供应商
$\alpha v\beta 6$	抗-整合素 $\alpha v\beta 6$ 抗体, 克隆10D5 (#MAB2077Z)	密理博公司
$\alpha v\beta 6$	264RAD	阿斯利康公司 肿瘤学iMED
$\alpha v\beta 6$	6.2G2	Stromedix公司
$\alpha v\beta 6$	整合素 $\beta 6$ (C-19)	圣克鲁斯公司
总 Akt (全, 1, 2, 3) & 磷酸 -	Akt (全) (C67E7) (#4691) Akt1 (C73H10) (#2938)	细胞信号传导技术公司
Akt	Akt 2 (D6G4) (#3063) Akt 3 (62A8) (#3788)	(CST)
	磷酸-Akt (Ser473) (D9E) XP (#4060) & 磷酸 - Akt (Thr308) (#9275)	
β -肌动蛋白	β -肌动蛋白 (13E5) (#4970)	CST
总 & 磷酸-HER2	HER2/ErbB2 (29D8) (#2165) 磷酸-HER2/ErbB2 (Tyr1221/1222) (6B12) (#2243)	CST
总 & 磷酸-HER3	HER3/ErbB3 (1B2E) (#4754) 磷酸-HER3/ErbB3 (Tyr1289) (21D3) (#4791)	CST
总 & 磷酸-Smad2	Smad2 (D43B4) (#5339), 磷酸-Smad2 磷酸-Smad2 (Ser465/467) (#3101)	CST

图13

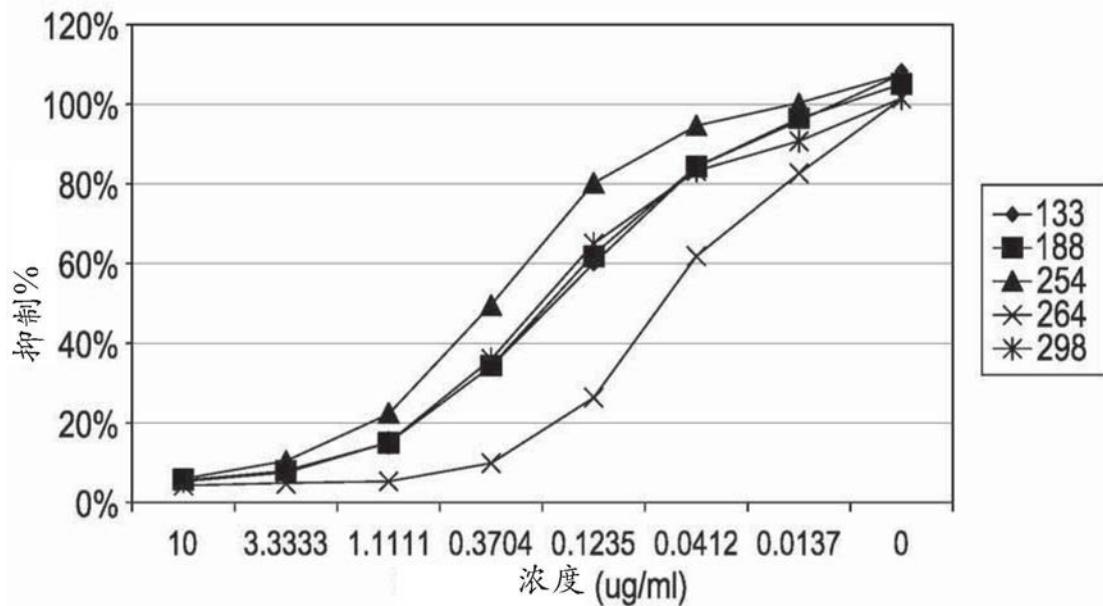
GST-LAP与 $\alpha v\beta 6$ 结合的抑制百分比

图14

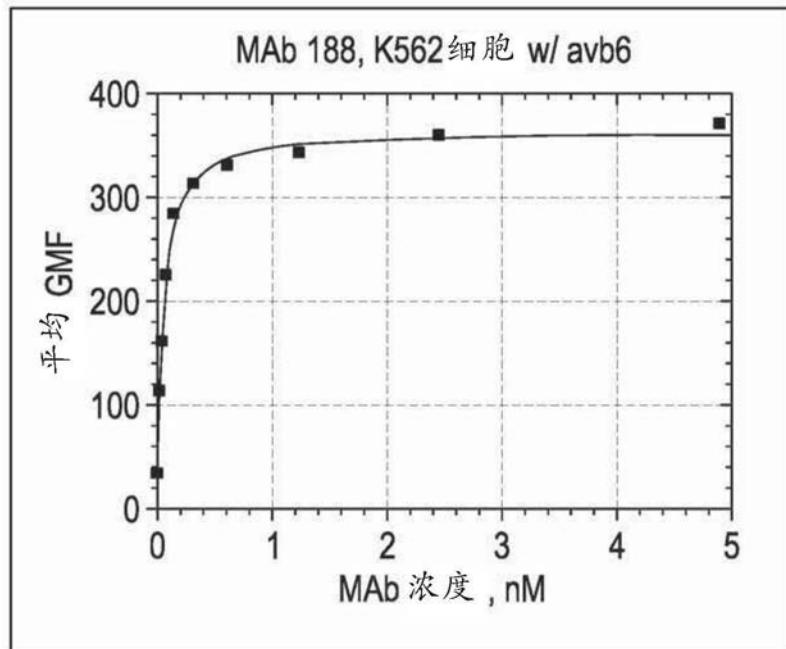


图15A

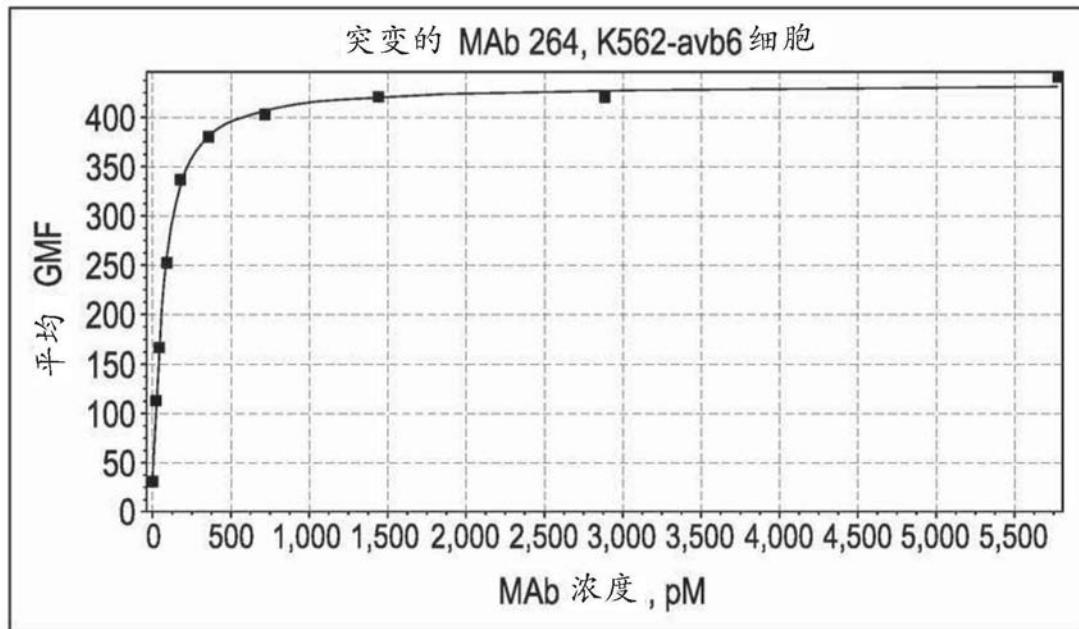


图15B

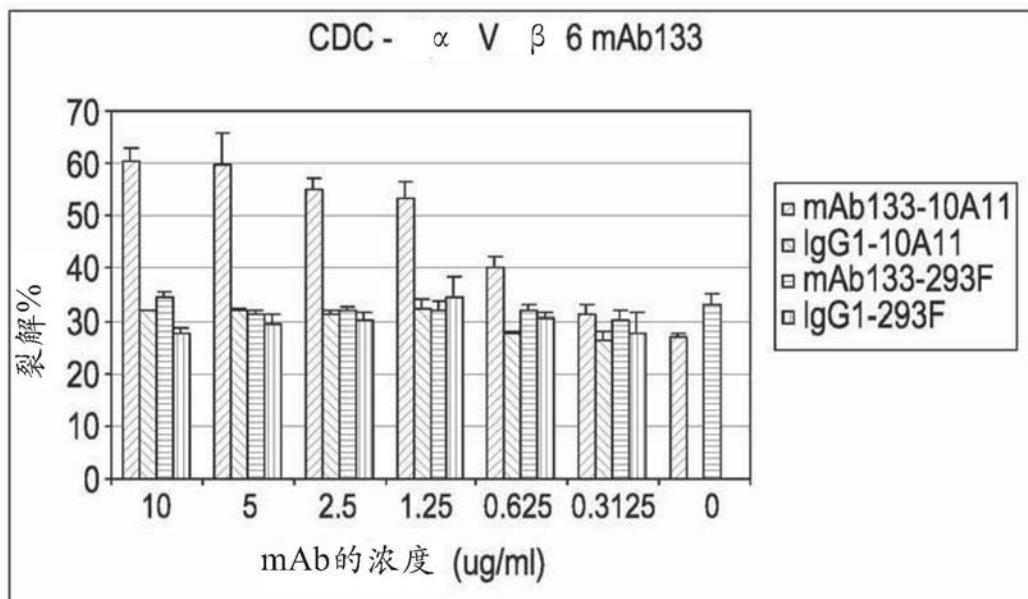


图16A

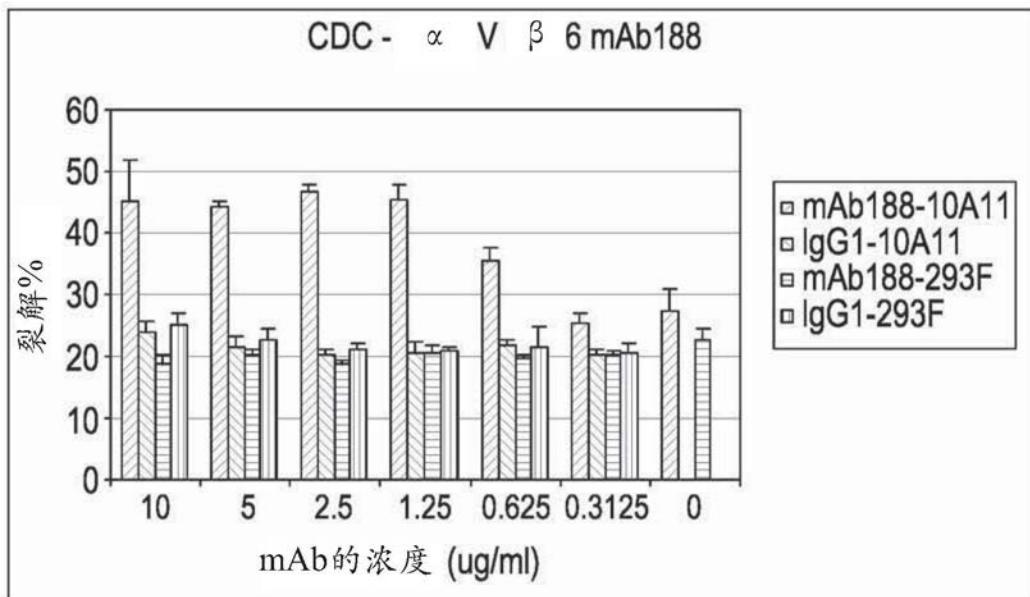


图16B

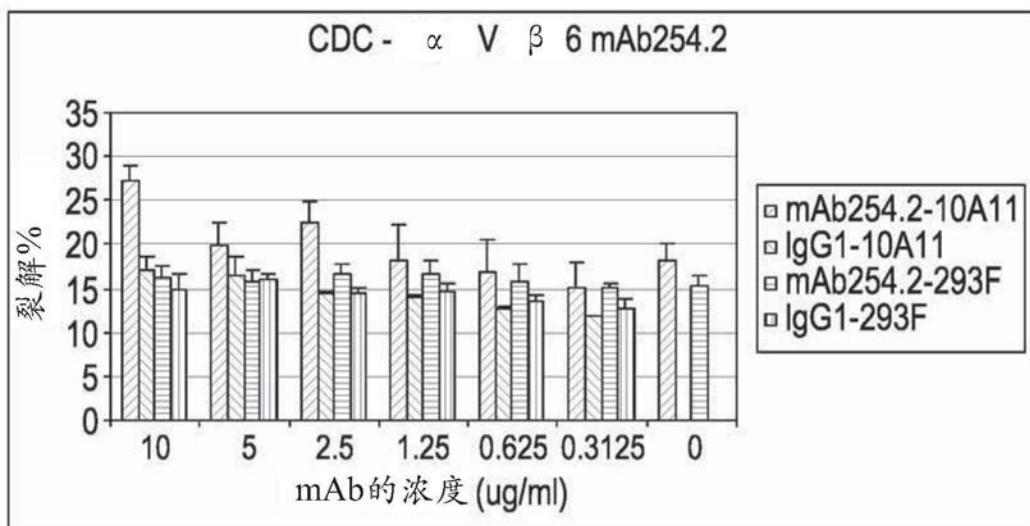


图16C

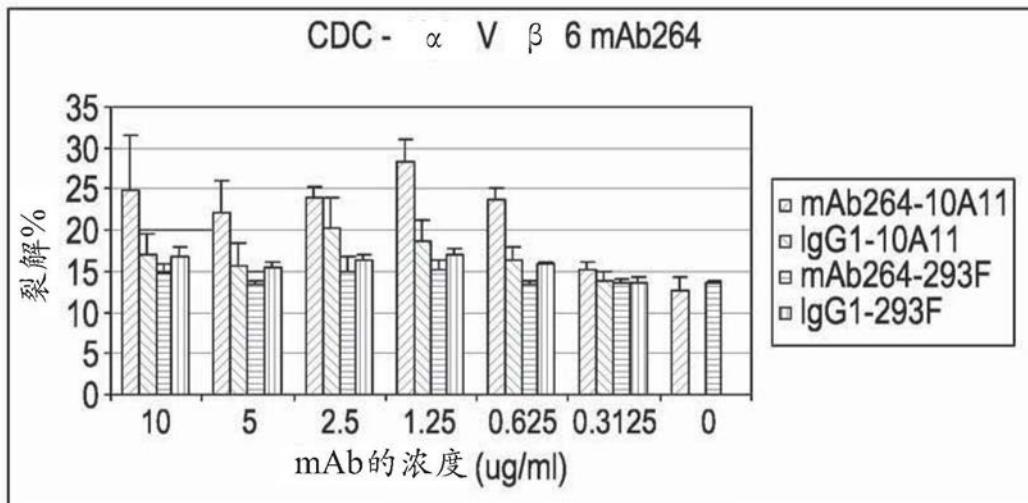


图16D

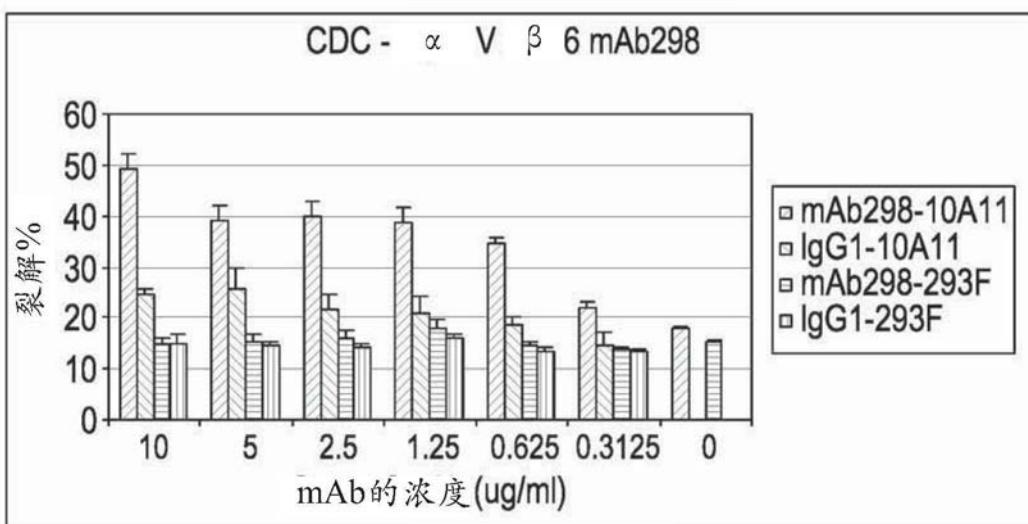


图16E

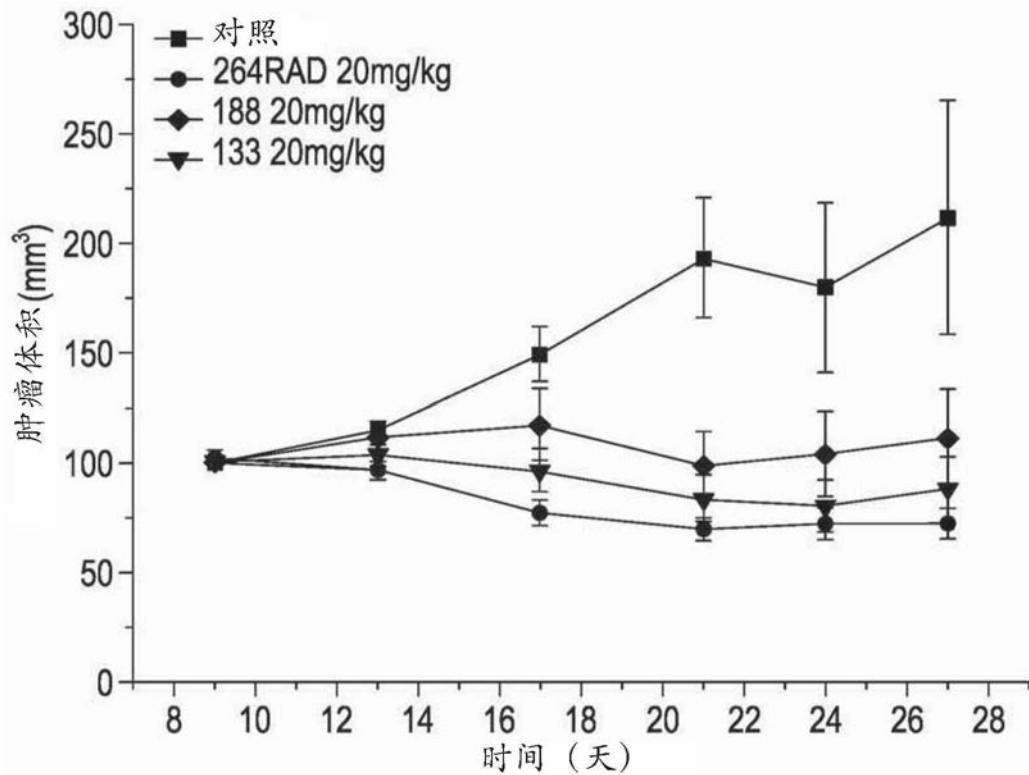


图17

使用底特律562细胞，用2 mM MgCl₂进行的细胞粘附测定

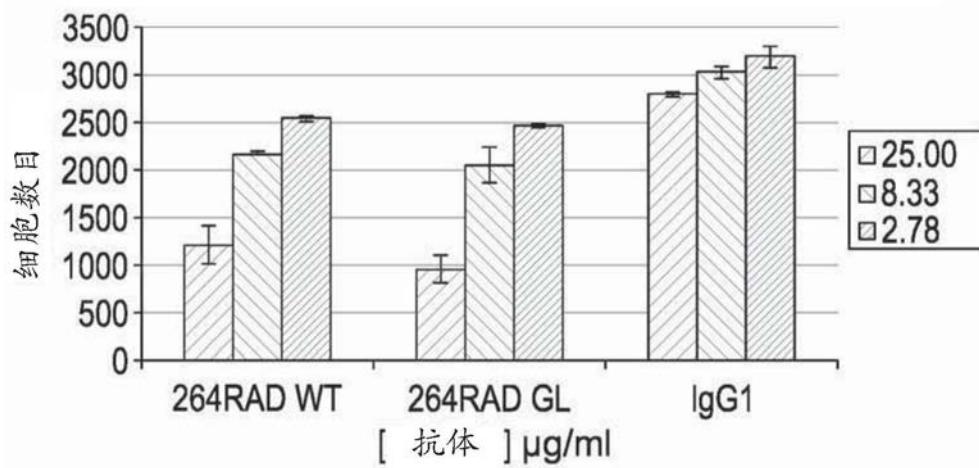


图18