



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102924598 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 31

(21) 申请号 201210067222. 6

代理人 孙式洪

(22) 申请日 2003. 03. 13

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

60/364, 991 2002. 03. 13 US

60/426, 286 2002. 11. 13 US

C07K 16/28 (2006. 01)

C12N 5/20 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 19/04 (2006. 01)

A61P 17/02 (2006. 01)

A61P 1/16 (2006. 01)

(62) 分案原申请数据

03808906. 8 2003. 03. 13

A61P 11/00 (2006. 01)

A61P 13/12 (2006. 01)

A61P 17/06 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

A61P 7/04 (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

C12R 1/91 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

PTA-3645 2001. 08. 16

PTA-3646 2001. 08. 16

PTA-3647 2001. 08. 16

PTA-3648 2001. 08. 16

PTA-3649 2001. 08. 16

PTA-3896 2001. 12. 05

PTA-3897 2001. 12. 05

PTA-3898 2001. 12. 05

PTA-3899 2001. 12. 05

PTA-3900 2001. 12. 05

(56) 对比文件

EP 0719859 A1, 1996. 07. 03, 全文.

US 2001/0056076 A1, 2001. 12. 27, 全文.

(73) 专利权人 拜奥根 IDEC 马萨诸塞公司

地址 美国马萨诸塞

专利权人 加利福尼亚大学董事会

审查员 吴立

(72) 发明人 S·M·维欧雷特 P·H·维尼尔博

K·J·西蒙 D·舍帕德

D·R·利昂

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

权利要求书2页 说明书31页

序列表23页 附图24页

(54) 发明名称

抗 $\alpha_v\beta_6$ 抗体

(57) 摘要

本发明涉及分子生物学领域, 具体涉及抗 $\alpha_v\beta_6$ 抗体。

1. 一种抗体,其特异性结合 $\alpha_v\beta_6$ 且含有与杂交瘤产生的抗体相同的重链和轻链互补决定区,其中所述杂交瘤选自:

ATCC 保藏号为 PTA-3646 的杂交瘤 6. 2B1、ATCC 保藏号为 PTA-3898 的杂交瘤 7. 1G10、ATCC 保藏号为 PTA-3899 的杂交瘤 7. 7G5、ATCC 保藏号为 PTA-3900 的杂交瘤 7. 1C5。

2. 权利要求 1 的抗体,其中该抗体是 $\alpha_v\beta_6$ 结合片段。

3. 权利要求 1 的抗体,其中该抗体是单链抗体。

4. 权利要求 1 的抗体,其中该抗体是 IgG1 抗体。

5. 权利要求 1 的抗体,其中该抗体含有与 ATCC 保藏号为 PTA-3646 的杂交瘤 6. 2B1 产生的抗体相同的重链和轻链互补决定区。

6. 权利要求 1 的抗体,其中该抗体含有与 ATCC 保藏号为 PTA-3898 的杂交瘤 7. 1G10 产生的抗体相同的重链和轻链互补决定区。

7. 权利要求 1 的抗体,其中该抗体含有与 ATCC 保藏号为 PTA-3899 的杂交瘤 7. 7G5 产生的抗体相同的重链和轻链互补决定区。

8. 权利要求 1 的抗体,其中该抗体含有与 ATCC 保藏号为 PTA-3900 的杂交瘤 7. 1C5 产生的抗体相同的重链和轻链互补决定区。

9. 权利要求 1 的抗体,其中抗体与 $\alpha_v\beta_6$ 的结合依赖于二价阳离子。

10. 权利要求 9 的抗体,其中二价阳离子是 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 。

11. 权利要求 1 的抗体,其中抗体与 $\alpha_v\beta_6$ 的结合不依赖于二价阳离子。

12. 特异性结合 $\alpha_v\beta_6$ 的抗体,其中该抗体:

(i) 是由选自如下组的杂交瘤产生的抗体的人源化形式:ATCC 保藏号为 PTA-3647 的杂交瘤 6. 1A8、ATCC 保藏号为 PTA-3649 的杂交瘤 6. 3G9、ATCC 保藏号为 PTA-3645 的杂交瘤 6. 8G6、ATCC 保藏号为 PTA-3646 的杂交瘤 6. 2B1、ATCC 保藏号为 PTA-3898 的杂交瘤 7. 1G10、ATCC 保藏号为 PTA-3899 的杂交瘤 7. 7G5 和 ATCC 保藏号为 PTA-3900 的杂交瘤 7. 1C5;和

(ii) 在抗体的作为糖基化位点的氨基酸残基处含有突变以使得糖基化位点消除,其中所述抗体选自由如下组成的组:杂交瘤 6. 1A8、杂交瘤 6. 3G9、杂交瘤 6. 8G6、杂交瘤 6. 2B1、杂交瘤 7. 1G10、杂交瘤 7. 7G5 和杂交瘤 7. 1C5。

13. 权利要求 12 的抗体,其中所述抗体:

(i) 是由 ATCC 保藏号为 PTA-3649 的杂交瘤 6. 3G9 杂交瘤产生的抗体的人源化形式;和

(ii) 在由杂交瘤 6. 3G9 杂交瘤产生的抗体的作为糖基化位点的氨基酸残基处含有突变以使得糖基化位点消除。

14. 一种组合物,其含有权利要求 1-13 中任何一项的抗体,和药学可接受的载体。

15. 权利要求 14 的组合物,其中所述抗体与细胞毒性剂偶联。

16. 权利要求 14 的组合物,其中所述抗体是不依赖阳离子的抗体。

17. 保藏号为 ATCC PTA-3647 的杂交瘤细胞 6. 1A8。

18. 保藏号为 ATCC PTA-3648 杂交瘤细胞 6. 2B10。

19. 保藏号为 ATCC PTA-3649 杂交瘤细胞 6. 3G9。

20. 保藏号为 ATCC PTA-3645 杂交瘤细胞 6. 8G6。

21. 保藏号为 ATCC PTA-3646 杂交瘤细胞 6. 2B1。

22. 保藏号为 ATCC PTA-3896 杂交瘤细胞 6. 2A1。
23. 保藏号为 ATCC PTA-3897 杂交瘤细胞 6. 2E5。
24. 保藏号为 ATCC PTA-3898 杂交瘤细胞 7. 1G10。
25. 保藏号为 ATCC PTA-3899 杂交瘤细胞 7. 7G5。
26. 保藏号为 ATCC PTA-3900 杂交瘤细胞 7. 1C5。
27. 权利要求 14 的组合物用于制备治疗人研究对象的药物的用途, 其中所述人研究对象具有肺纤维化。
28. 权利要求 14 的组合物用于制备治疗人研究对象的药物的用途, 其中所述人研究对象具有肾纤维化。
29. 权利要求 14 的组合物用于制备治疗人研究对象的药物的用途, 其中所述人研究对象具有咽癌。
30. 由 ATCC 保藏号为 PTA-3647 的杂交瘤 6. 1A8 产生的抗体的人源化形式, 其中所述抗体与毒素、放射活性化合物或抗癌剂缀合, 其用于选择性靶向和抑制癌细胞的生长。
31. 由 ATCC 保藏号为 PTA-3645 的杂交瘤 6. 8G6 产生的抗体的人源化形式, 其中所述抗体与毒素、放射活性化合物或抗癌剂缀合, 其用于选择性靶向和抑制癌细胞的生长。

抗 $\alpha_v\beta_6$ 抗体

发明领域

[0001] 本发明涉及分子生物学领域,具体涉及抗 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白抗体。

[0002] 发明背景

[0003] 整联蛋白是一个细胞表面受体超家族,介导细胞-细胞和细胞-基质粘附。这些蛋白质被认为在发育和组织损伤过程中为细胞的生长、迁移和分化提供锚定以及信号。整联蛋白还与细胞的去分化和侵入有关,特别是在细胞失去它们的特化形态,而成为转移的癌细胞时。

[0004] 整联蛋白是由两个非共价连接的亚基- α 和 β 组成的异源二聚体蛋白质。整联蛋白的结合特异性是由 18 种不同 α 链中的一些与 8 种不同 β 链中的一些组合所规定的。 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白能够结合多种配基,包括纤连蛋白、腱生蛋白、玻连蛋白和最近鉴定的潜伏相关肽 (LAP),即一种 278 个氨基酸的肽,其作为前体 TGF- β 蛋白的一部分合成 (Munger 等人, Cell 96 (3):319-328 (1999))。在分泌过程中, LAP 作为 N 端肽从 TGF- β 的成熟形式上切下,但是仍然与 TGF- β 非共价结合,从而保持潜伏状态。该复合物不能与 TGF- β 受体结合,因此无生物学活性。 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白能够直接结合 LAP 内所含的 RGD 基序,导致 LAP 的释放和 TGF- β 的激活。由于 $\alpha_v\beta_6$ 与 LAP 的结合对于 TGF- β 转化为活性状态可能非常重要,因此阻断这种结合可导致 $\alpha_v\beta_6$ 介导的 TGF- β 激活的抑制和相关的纤维化病理学。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明是基于抗 $\alpha_v\beta_6$ 高亲和力抗体的发现和表征,包括这些抗体的互补决定区 (CDRs) 中关键氨基酸残基的鉴定和分析。

[0007] 本发明包括一种单克隆抗体,其可以 (a) 特异性结合 $\alpha_v\beta_6$; (b) 抑制 $\alpha_v\beta_6$ 与其配体 (如 LAP、纤连蛋白、玻连蛋白和腱生蛋白) 的结合,其 IC_{50} 值低于 10D5 的 IC_{50} 值 (国际专利申请公开文本 WO 99/07405); (c) 阻断 TGF- β 的激活; (d) 含有提供 $\alpha_v\beta_6$ 结合特异性的 CDR 中的某些氨基酸序列 (如图 7A 和 7B 所示); (e) 特异性结合 β_6 亚基; 和 / 或 (f) 在免疫染色程序,如石蜡包埋组织的免疫染色中识别 $\alpha_v\beta_6$ 。

[0008] 已经发现,与 $\alpha_v\beta_6$ 结合的抗体可以被分类为生物物理学上不同的类和亚类。一类抗体显示阻断配体 (如 LAP) 与 $\alpha_v\beta_6$ 结合的能力 (阻断剂)。这类抗体可以被进一步分为依赖阳离子的阻断剂和不依赖阳离子的阻断剂之亚类。一些依赖阳离子的阻断剂含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD) 肽序列,而不依赖阳离子的阻断剂不含 RGD 序列。另一类抗体显示与 $\alpha_v\beta_6$ 结合的能力,并且不能阻断 $\alpha_v\beta_6$ 与配体的结合 (非阻断剂)。

[0009] 因此,在本发明的一些实施方案中,本发明的一些抗体与 $\alpha_v\beta_6$ 的结合是依赖二价阳离子的,而有些是不依赖二价阳离子的。示例性的阳离子是 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 。

[0010] 在一些实施方案中,抗体包含与杂交瘤 6.1A8、6.3G9、6.8G6、6.2B1、6.2B10、6.2A1、6.2E5、7.1G10、7.7G5 或 7.1C5 产生的抗体相同的重链和轻链多肽序列。

[0011] 在一些实施方案中,抗体包含一条重链和 / 或一条轻链,重链的互补决定区 (CDR) 1、2 和 3 分别基本 (即除了一些保守性变异之外) 由 SEQ ID NOs:1、4 和 7 的序列组成,该轻链的 CDRs 1、2 和 3 分别基本由 SEQ ID NOs:10、13 和 15 的序列组成。

[0012] 在一些实施方案中,抗体包含一条重链和 / 或一条轻链,重链的 CDRs 1、2 和 3 分别基本由 SEQ ID NOs :3、5 和 8 的序列组成,该轻链的 CDRs 1、2 和 3 分别基本由 SEQ ID NOs :11、14 和 17 的序列组成。

[0013] 在一些实施方案中,抗体包含一条重链和 / 或一条轻链,重链的 CDRs 1、2 和 3 分别基本由 SEQ ID NOs :3、6 和 9 的序列组成,该轻链的 CDRs 1、2 和 3 分别基本由 SEQ ID NOs :12、14 和 18 的序列组成。

[0014] 在一些实施方案中,抗体包含一条重链和 / 或一条轻链,重链的 CDRs 1、2 和 3 分别基本由 SEQ ID NOs :2、46 和 47 的序列组成,该轻链的 CDRs 1、2 和 3 分别基本由 SEQ ID NOs :48、13 和 16 的序列组成。

[0015] 在一些实施方案中,抗体包含一条重链和 / 或一条轻链,重链的 CDRs 1、2 和 3 分别基本由 SEQ ID NOs :49、51 和 53 的序列组成,该轻链的 CDRs 1、2 和 3 分别基本由 SEQ ID NOs :55、57 和 59 的序列组成。

[0016] 在一些实施方案中,抗体包含一条重链和 / 或一条轻链,重链的 CDRs 1、2 和 3 分别基本由 SEQ ID NOs :50、52 和 54 的序列组成,该轻链的 CDRs 1、2 和 3 分别基本由 SEQ ID NOs :56、58 和 60 的序列组成。

[0017] 在一些实施方案中,抗体包含 SEQ ID NOs :19-36 和 61-62 中任何一个的重链可变域序列。

[0018] 在一些实施方案中,抗体分别包含下列重链和轻链可变域序列:

[0019] (1)SEQ ID NOs :19 和 37 ;

[0020] (2)SEQ ID NOs :20 或 21,和 SEQ ID NO :38 ;

[0021] (3)SEQ ID NOs :22 和 43 ;

[0022] (4)SEQ ID NOs :23 和 44 ;

[0023] (5)SEQ ID NOs :24 和 45 ;

[0024] (6)SEQ ID NOs :25 或 26,和 SEQ ID NOs :42 ;

[0025] (7)SEQ ID NOs 27、28 或 29,和 SEQ ID NOs :39 ;

[0026] (8)SEQ ID NOs :34 或 35,和 SEQ ID NOs :40 ;

[0027] (9)SEQ ID NOs :36 和 41 ;

[0028] (10)SEQ ID NOs :61 和 63 ;或

[0029] (11)SEQ ID NOs :62 和 64。

[0030] 在一些实施方案中,抗体可特异性结合 $\alpha_v\beta_6$, 但是不抑制 $\alpha_v\beta_6$ 与潜伏相关肽 (LAP) 的结合。至少有些这样的抗体能够与石蜡包埋组织切片中的 $\alpha_v\beta_6$ 结合,因此能够用于诊断用途。示例性的抗体包括 6. 2A1 和 6. 2E5。

[0031] 本发明也包括可结合与上述任何抗体相同表位的抗体。

[0032] 本发明也包括含有本发明的一种或多种抗体和药学可接受的载体的组合物。在一些这样的组合物中,抗体与细胞毒性剂 (即影响细胞的存活力和 / 或功能的物质) 如毒素或放射性核素偶联。这些组合物中的抗体可以是依赖阳离子的抗体。这些组合物能够对患有或者具有患 $\alpha_v\beta_6$ 介导的疾病危险的对象 (例如哺乳动物,如人) 施用,以治疗 (例如缓解、减轻、降低、阻止、延迟发生) 该疾病。这类疾病的例子包括,但不限于:纤维化 (例如硬皮病、结疤、肝纤维化、肺纤维化和肾纤维化);银屑病;癌症 (例如上皮癌;口腔、皮肤、子

宫颈、卵巢、咽、喉、食道、肺、乳房、肾或结肠直肠癌)；奥尔波特综合征；急性及慢性肺、肝、肾和其它内脏损伤；肺、肝、肾和其它内脏的硬化。患这些疾病的危险可能是由于遗传诱因；某些生活方式，如吸烟和酗酒；接触环境污染物，如石棉；生理疾病，如糖尿病、肝炎病毒感染（例如丙型肝炎病毒感染）、自身免疫病；和医学治疗，如放射治疗。

[0033] 本发明还包括检测来自哺乳动物（例如人）的组织标本中 $\alpha_v\beta_6$ 的方法，包括使组织标本接触本发明的抗体，如 6.2A1 和 6.2E5。

[0034] 本发明还包括杂交瘤 6.1A8、6.2B10、6.3G9、6.8G6、6.2B1、6.2A1、6.2E5、7.1G10、7.7G5 和 7.1C5 的细胞；包含编码 SEQ ID NOs:19-45 和 61-64 中任何一种的序列的分离的核酸；包含 SEQ ID NOs:19-45 和 61-64 中任何一种的氨基酸序列的分离的多肽。

[0035] 本发明的抗体是指完整抗体，例如，含有两条重链和两条轻链的抗体，或者是指完整抗体的抗原结合片段，如 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段或 F(v) 片段。本发明的抗体可以是鼠抗体或其同源物，或者是完整的人抗体。本发明的抗体也可以是人源化抗体、嵌合抗体或单链抗体。本发明的抗体可以是任何同种型和亚型的，如 IgA（例如 IgA1 和 IgA2）、IgG（如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4）、IgE、IgD、IgM，其中免疫球蛋白的轻链可以是 κ 型或 λ 型。

[0036] 在一些实施方案中，本发明的抗体可以在重链的一个或多个（例如 2、3、4、5 或 6 个）特定位点处含有突变（例如缺失、置换或添加），使得该抗体的效应物功能（例如该抗体结合 Fc 受体或补体因子的能力）发生改变，而不影响抗体的抗原结合能力。在另外一些实施方案中，本发明的抗体可以在作为糖基化位点的氨基酸残基处含有突变，使得糖基化位点消除。这种抗体可能具有临床上有利的、降低的效应物功能或其它不希望的功能，而保留其抗原结合亲和力。糖基化位点的突变也可能有利于工艺发展（例如蛋白质的表达和纯化）。在另外一些实施方案中，重链或轻链可能含有提高亲和力或效能的突变。

[0037] 几种融合 #6 和融合 #7 杂交瘤根据布达佩斯条约保藏已在美国典型培养物保藏中心 (ATCC; P. O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA)。杂交瘤克隆 6.1A8、6.2B10、6.3G9、6.8G6 和 6.2B1 于 2001 年 8 月 16 日保藏，保藏号分别是 ATCC PTA-3647、-3648、-3649、-3645 和 -3646。杂交瘤克隆 6.2A1、6.2E5、7.1G10、7.7G5 和 7.1C5 在 2001 年 12 月 5 日保藏，保藏号分别是 ATCC PTA-3896、-3897、-3898、-3899 和 -3900。见下文表 1。

[0038] 本发明的抗体可用于治疗由 $\alpha_v\beta_6$ 与配体（如 LAP 和纤连蛋白）结合介导的任何临床上不希望的病症或疾病（如此处所述）。由于更高的亲和力或亲合力，以及与配体结合的阳离子依赖性或非依赖性，这些抗体可能比以前所知的 $\alpha_v\beta_6$ 抗体更有效。

[0039] 除了本发明的抗体特别是阻断剂的治疗用途之外，非阻断剂类的抗体也能够用于诊断目的，如用于抗原捕获测定、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、免疫组化等。

[0040] 通过下列详述、附图和权利要求书，本发明的其它特征和优点将是显而易见的。

[0041] 附图简述

[0042] 图 1A 和 1B 是显示细胞捕获测定结果的条形图，该试验是测定多种抗 $\alpha_v\beta_6$ 单克隆抗体（“mAb”）结合 β_6 转染的 FDC-P1 细胞的能力（未转染的细胞作为对照）。

[0043] 图 2A 是显示 ELISA 测定结果的图，该试验是测定多种纯化的抗 $\alpha_v\beta_6$ “融合 6”单克隆抗体结合可溶性重组人 $\alpha_v\beta_6$ （“hs $\alpha_v\beta_6$ ”）的能力。这些抗体通过用截短的可溶性人 $\alpha_v\beta_6$ 免疫 $\beta_6^{-/-}$ 小鼠产生。图例中的数字表示克隆数。相应的克隆名称见表 2。

[0044] 图 2B 是显示 ELISA 测定结果的图,该试验是测定多种纯化的抗 $\alpha_v\beta_6$ “融合 7”单克隆抗体结合可溶性重组 hs $\alpha_v\beta_6$ 的能力。这些抗体通过用 β_6 转染的 NIH 3T3 细胞 (融合 #7) 免疫 $\beta_6^{-/-}$ 小鼠产生。

[0045] 图 3A-F 是显示多种抗 $\alpha_v\beta_6$ 单克隆抗体与 hs $\alpha_v\beta_6$ 结合的不同阳离子依赖性的图。

[0046] 图 4A 和 4B 是显示融合 #6 和融合 #7 单克隆抗体分别抑制生物素 -hs $\alpha_v\beta_6$ 与 LAP 结合的图。

[0047] 图 5A-E 是显示本发明的示例性单克隆抗体抑制 β_6 转染的 FDC-P1 细胞与 LAP 结合的图。图 5A 和 5B 显示融合 #6 抗体的结果。图 5C-E 显示融合 #7 抗体的结果。

[0048] 图 6A 和 6B 是显示融合 #6 和融合 #7 抗体分别抑制 $\alpha_v\beta_6$ -介导的 TGF- β 激活的图,其中使用 PAI-1 萤光素酶报道基因测定监测 TGF- β 的激活。

[0049] 图 7A 显示 $\alpha_v\beta_6$ 单克隆抗体 6. 1A8、6. 8G6 (亚克隆 A 和 B)、7. 7G5、6. 2B1、6. 3G9、6. 2B10 (亚克隆 A 和 B)、6. 2G2、6. 2A1、6. 4B4 (亚克隆 A、B 和 C)、7. 10H2、7. 9H5、7. 4A3 (亚克隆 A 和 B)、7. 1C5 (亚克隆 A 和 B) 和 7. 1G10 的重链可变域的氨基酸序列。抗体 6. 1A8、6. 8G6 和 7. 7G5 与 $\alpha_v\beta_6$ 的结合是依赖阳离子的,而抗体 6. 2B1、6. 2A1、6. 3G9、6. 2B10、6. 4B4、7. 1C5 和 7. 1G10 则是不依赖阳离子的 (见下文)。括号中的数字代表氨基酸残基位点。CDR 在大框中,而含有斜体氨基酸的小框则代表具体抗体在不同克隆中的多态性。

[0050] 图 7B 显示 $\alpha_v\beta_6$ 单克隆抗体 6. 1A8、6. 8G6、6. 4B4、6. 2A1、7. 1C5、7. 1G10、6. 2B10、7. 7G5、6. 2B1 和 6. 3G9 的轻链可变域的氨基酸序列。

[0051] 图 8 是一张散布图,显示人乳腺癌和人鳞状癌组织切片中 $\alpha_v\beta_6$ 的表达。正常人组织只显示可以忽略的 $\alpha_v\beta_6$ 表达水平。

[0052] 图 9A 和 9B 是二次曲线图,显示两种抗 $\alpha_v\beta_6$ 抗体 6. 8G6 和 6. 3G9 分别对可溶性 $\alpha_v\beta_6$ 的溶液结合亲和力。

[0053] 图 10A 和 10B 是两张条形图,证实纯化的单克隆抗体与生物素化的 6. 3G9 和生物素化的 6. 8G6 分别竞争结合 $\alpha_v\beta_6$ 的能力。

[0054] 图 11 是一张条形图,显示在用抗 $\alpha_v\beta_6$ 单克隆抗体治疗处理的 UUO 动物的肾脏中,平滑肌肌动蛋白染色的百分比。

[0055] 图 12 显示根据 FACS 分析,肿瘤细胞系上 $\alpha_v\beta_6$ 的表达 (图右侧),以及单克隆抗体 6. 3G9 和 6. 4B4 对肿瘤细胞系与 LAP 配体结合的抑制 (图左侧)。

[0056] 图 13 是一张条形图,证实抗 $\alpha_v\beta_6$ 单克隆抗体 6. 3G9、6. 8G6 和 6. 4B4 对三种肿瘤细胞系与 LAP 配体结合的抑制。单克隆抗体的结合与不添加试验单克隆抗体的总结合 (TB) 并与单独 BSA 对照的非特异性结合 (NSB) 相比较。

[0057] 图 14A 和 14B 显示在 33 天的研究期内,抗 $\alpha_v\beta_6$ 单克隆抗体 6. 3G9 和 6. 4B4 分别对皮下植入 Detroit 562 细胞产生的肿瘤的作用。

[0058] 图 15A-C 显示抗 $\alpha_v\beta_6$ 单克隆抗体对博来霉素诱导的肺纤维化的作用。(A) 使用 6. 3G9 单克隆抗体的抗体治疗在第 0 天施用博来霉素时开始,监测 30 天;(B) 使用 6. 3G9 单克隆抗体的抗体治疗在博来霉素治疗 15 天后开始,监测 30 天;(C) 使用 6. 3G9、6. 8G6 和 6. 4B4 单克隆抗体的抗体治疗在博来霉素治疗 15 天后开始,监测延长的 60 天。在图 15A 和 15B 中,左侧的条图代表 μg 羟脯氨酸 / 肺,而右侧的条图显示与盐水处理的小鼠 (无博来

霉素)相比,羟脯氨酸的增加百分数。在图 15C 中,该图显示每个肺的羟脯氨酸含量。

[0059] 发明详述

[0060] 本发明表征了对于整联蛋白 $\alpha_v\beta_6$ 特异的抗体的类和亚类。至少一类抗体(阻断剂)能够阻断 $\alpha_v\beta_6$ 与 LAP 的结合或者阻止 TGF- β 的激活。

[0061] 以下描述了制备本发明的抗体的多种方法。本领域公知但是在此没有具体描述的方法也包含在发明的范围内。例如,本发明的抗体也能够用噬菌体展示抗体文库鉴定,如 Smith, Science 228:1315-7(1985);美国专利 5,565,332、5,733,743、6,291,650 和 6,303,313 所述。本发明的另外一些抗体能够如下制备:将此处鉴定的重链与非相关(noncognate)轻链(例如通过噬菌体展示技术鉴定的轻链)相偶联。

[0062] 非人杂交瘤抗体

[0063] 本发明的单克隆抗体能够通过众所周知的杂交瘤技术产生。为此, $\beta_6^{-/-}$ 动物(例如小鼠、大鼠或兔)用如下材料免疫:纯化的或粗 $\alpha_v\beta_6$ 制品,用编码 α_v 、 β_6 或这两种抗原的 cDNA 构建体转染的细胞,组成型表达 $\alpha_v\beta_6$ 的细胞,等等。可以作为纯化的蛋白质、在细胞上表达的蛋白质、其蛋白质片段或肽,或者作为裸 DNA 或编码该蛋白质、蛋白质片段或肽的病毒载体递送这些抗原。然后检测免疫动物的血清中抗 $\alpha_v\beta_6$ 抗体的存在。从检测为阳性的动物中分离 B 细胞,用这些 B 细胞制备杂交瘤。

[0064] 筛选杂交瘤分泌的抗体,这是根据它们特异性结合 $\alpha_v\beta_6$ (例如结合 β_6 转染的细胞,而不结合未转染的亲本细胞)的能力,和其它任何希望的特征,例如含有希望的 CDR 共有序列,以低于已知抗 $\alpha_v\beta_6$ 抗体 10D5 的 IC_{50} 值抑制(或者对于非阻断剂,不抑制)LAP 与 $\alpha_v\beta_6$ 的结合,或抑制 TGF- β 的激活。

[0065] 筛选实验中检测为阳性的杂交瘤细胞于使细胞向培养基内分泌单克隆抗体的条件下在营养培养基中培养。然后收集条件杂交瘤培养上清液,纯化上清液中所含的抗体。另外,希望的抗体也可以通过向未免疫的动物(例如小鼠)的腹腔内注射杂交瘤细胞产生。杂交瘤细胞在腹腔内增殖,分泌抗体,积累为腹水。然后可以用注射器从腹腔中吸出腹水,收集抗体。

[0066] 单克隆抗体也能够如下产生:从希望的杂交瘤中分离编码抗体的 cDNA,用此 cDNA 转染哺乳动物宿主细胞(例如 CHO 或 NSO 细胞),培养转染的宿主细胞,从培养基中回收抗体。

[0067] 嵌合抗体

[0068] 本发明的单克隆抗体也能够通过工程构建相关(cognate)杂交瘤(例如鼠、大鼠或兔)抗体产生。例如,可以通过重组 DNA 技术改变相关抗体,使得重链和/或轻链的部分或全部铰链区和/或恒定区被替换为来自另外一个种(例如人)的抗体的相应成分。通常,工程化抗体的可变域与相关抗体的可变域相同或基本相同。这种工程化抗体被称为嵌合抗体,当对作为铰链区和/或恒定区来源的种(例如人)的个体施用,抗原性低于相关抗体。制备嵌合抗体的方法在本领域公知。

[0069] 本发明包括的嵌合抗体可包含一个重链可变域和/或一个轻链可变域,重链可变域含有与 SEQ ID NOs:19-36 中任何一个相同(或基本相同)的序列,轻链可变域含有与 SEQ ID NOs:37-45 中任何一个相同(或基本相同)的序列。

[0070] 优选的人恒定区包括来源于 IgG1 和 IgG4 的恒定区。

[0071] 完全人抗体

[0072] 本发明的单克隆抗体还包括完全人抗体。它们可以用体外免疫 (prime) 的人脾细胞制备, 如 Boerner 等人, J. Immunol. 147 :86-95(1991) 所述, 或者用噬菌体展示抗体文库制备, 如美国专利 6, 300, 064 所述。

[0073] 生产完全人抗体的其它一些方法包括使用含有灭活的内源 Ig 基因座并且对于未重排的人抗体重链和轻链基因而言是转基因的非人动物。这些转基因动物可以用 $\alpha_v\beta_6$ 免疫, 然后由来源于它们的 B 细胞制备杂交瘤。这些方法在下列文献中描述, 例如: 关于含有人 Ig 小基因座的转基因小鼠的多篇 GenPharm/Medarex (Palo Alto, CA) 公开文本 / 专利 (例如, Lonberg 美国专利 5, 789, 650); 关于 XEMOMICE 的多篇 Abgenix (Fremont, CA) 公开文本 / 专利 (例如, Kucherlapati 美国专利 6, 075, 181、6, 150, 584 和 6, 162, 963; Green 等人, Nature Genetics 7 :13-21(1994); 和 Mendez 等人, 15(2) :146-56(1997); 和关于 “transomic” 小鼠的多篇 Kirin (日本) 公开文本 / 专利 (例如, EP 843961, 和 Tomizuka 等人, Nature Genetics 16 :133-144(1997))。

[0074] 人源化抗体

[0075] 本发明的单克隆抗体还包括来源于其它种的人源化形式的相关抗 $\alpha_v\beta_6$ 抗体。人源化抗体是通过重组 DNA 技术产生的抗体, 其中用抗原结合不需要的人免疫球蛋白轻链或重链的一些或全部氨基酸 (例如可变域的恒定区和框架区) 置换来自相关非人抗体的轻链和重链的相应氨基酸。例如, 针对特定抗原的一种人源化鼠抗体在其重链和轻链上均含有 (1) 人抗体的恒定区; (2) 来自人抗体的可变域的框架区; 和 (3) 来自鼠抗体的 CDR。必要时, 能够将人框架区中的一个或多个残基改变为鼠抗体相应位点的残基, 以保持人源化抗体与抗原的结合亲和力。这种改变有时被称为“回复突变”。人源化抗体在人体中引发免疫反应的可能性通常低于嵌合人抗体, 因为前者含有相当少的非人成分。

[0076] 制备人源化抗体的方法在下列文献中描述, 例如: Winter EP 239400; Jones 等人, Nature 321 :522-525(1986); Riechmann 等人, Nature 332 :323-327(1988); Verhoeyen 等人, Science 239 :1534-1536(1988); Queen 等人, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86 :10029(1989); 美国专利 6, 180, 370; 和 Orlandi 等人, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86 :3833(1989)。鼠 (或其它非人) CDR 向人抗体上的移植通常如下实现。从杂交瘤中分离编码重链和轻链可变域的 cDNA。可变域, 包括 CDR 的 DNA 序列通过测序测定。编码 CDR 的 DNA 通过定点诱变转移到人抗体重链或轻链可变域编码序列的相应区。然后添加希望的同种型的人恒定区基因片段 (例如对于 CH 添加 $\gamma 1$, 对于 CL 添加 κ)。人源化重链和轻链基因在哺乳动物宿主细胞 (例如 CHO 或 NS0 细胞) 中共表达, 产生可溶性人源化抗体。为了促进抗体的大规模生产, 通常希望在含有抗体表达细胞的生物反应器中生产这些人源化抗体, 或者生产在乳汁中表达该抗体的转基因哺乳动物 (例如山羊、母牛或绵羊) (参见, 例如美国专利 5, 827, 690)。

[0077] 有时, CDR 向人框架的直接转移导致获得的抗体丢失抗原结合亲和力。这是因为在有些相关抗体中, 框架区内的某些氨基酸与 CDR 相互作用, 从而影响抗体的总抗原结合亲和力。在这种情况下, 为了保留相关抗体的抗原结合活性, 在接受抗体的框架区内引入“回复突变” (同上) 是很关键的。

[0078] 形成回复突变的普通方法在本领域中公知。例如, Queen 等人 (同上), Co 等

人, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88 :2869-2873(1991) 和 W090/07861(Protein Design Labs Inc.) 描述了一种包括两个关键步骤的方法。首先,通过计算机分析与相关鼠抗体 V 区框架的最佳蛋白质序列同源性,选择人 V 框架区。然后,用计算机模拟鼠 V 区的三级结构,以显示可能与鼠 CDR 相互作用的框架氨基酸残基,然后将这些鼠氨基酸残基叠加到同源的人框架上。

[0079] 对于这种两个步骤的方法,有几个标准用来设计人源化抗体。第一个标准是用来自通常与非人供体免疫球蛋白同源的特定人免疫球蛋白的框架作为人受体,或者使用来自多种人抗体的共有框架。第二个标准是,如果人受体残基异常且供体残基在框架的特定残基处是人序列典型的,则使用供体氨基酸而不是受体氨基酸。第三个标准是在紧邻 CDR 的位置处使用供体框架氨基酸残基而不是受体氨基酸残基。

[0080] 也可以使用一种不同的方法,如 Tempest, Biotechnology 9 :266-271(1991) 所述。对于这种方法,分别用来源于 NEWM 和 REI 重链和轻链的 V 区框架进行 CDR 移植,而不根本引入小鼠残基。使用该方法的一个优点是 NEWM 和 REI 可变区的三维结构通过 X 射线结晶学已知,因此 CDR 与 V 区框架残基的特异性相互作用能够容易地模拟。

[0081] 其它部分

[0082] 本发明的单克隆抗体还可包含用来实现希望的功能的其它部分。例如,这些抗体可以包括毒素部分(例如破伤风类毒素或蓖麻毒素)或放射性核素(例如 ^{111}In 或 ^{90}Y),用于杀伤抗体靶向的细胞(参见,例如美国专利 6,307,026)。这些抗体可以含有易于分离或检测的部分(例如生物素、荧光部分、放射性部分、组氨酸尾或其它肽标签)。这些抗体也可含有一个能够延长其血清半衰期的部分,例如聚乙二醇(PEG)部分。

[0083] 病情和动物模型

[0084] 本发明的抗体可用于 $\alpha_v\beta_6$ 介导的疾病的治疗,包括预防。例如,这些抗体通过阻断 TGF- β 的激活或阻断 $\alpha_v\beta_6$ 与其它任何配体(如纤连蛋白、玻连蛋白和腱生蛋白)的结合,能够用来治疗纤维化(如肺纤维化、急性肺损伤、肾纤维化、肝纤维化、奥尔波特综合征和硬皮病)。该方法的新颖性包括:(1) 阻断 TGF- β 的激活,而不是 TGF- β 与其受体的结合,(2) 能够局部抑制 TGF- β (即在 $\alpha_v\beta_6$ 上调位点处),而不是全身抑制,(3) 抑制 $\alpha_v\beta_6$ 与配体的结合。除了纤维化疾病以外,本发明的抗体还可用于治疗癌症或癌症转移(包括肿瘤生长和侵袭),特别是上皮癌。上皮癌的一个亚类是鳞状细胞癌,例如头颈癌、口、乳房、肺、前列腺、子宫颈、咽、结肠、胰腺和卵巢癌。我们使用新的 $\alpha_v\beta_6$ 单克隆抗体的研究证实 $\alpha_v\beta_6$ 在多种上皮癌中高表达,特别是在肿瘤的前缘。这些新抗体也能够用于 $\alpha_v\beta_6$ 介导的其它任何疾病,包括银屑病。

[0085] 本发明的治疗对罹患这些疾病的人和动物对象都有效。本发明适用的动物对象扩展到作为宠物或为了商业目的获得的家畜和牲畜。例子包括狗、猫、牛、马、绵羊、猪和山羊。

[0086] 本发明的抗体的效能可以用不同的动物模型检验。肺纤维化小鼠模型包括博来霉素诱导的(Pittet 等人, J. Clin. Invest. 107(12):1537-1544(2001);和 Munger 等人,同上)和放射诱导的肺纤维化(Franko 等人, Rad. Res. 140:347-355(1994))。在博来霉素处理的小鼠中, $\alpha_v\beta_6$ 的表达在肺上皮肺泡细胞中增加。但是 β_6 敲除小鼠受到保护,免遭博来霉素诱导的损伤和纤维化。

[0087] 肾纤维化小鼠模型包括 COL4A3-/- 小鼠(参见,例如 Cosgrove 等人, Amer.

J. Path. 157 :1649-1659(2000))、具有阿霉素诱导的损伤的小鼠 (Wang 等人, Kidney International 58 :1797-1804(2000) ;Deman 等人, Nephrol Dial Transplant 16 :147-150(2001))、db/db 小鼠 (Ziyadeh 等人, PNAS USA 97 :8015-8020(2000)) 和单侧输尿管阻塞的小鼠 (Fogo 等人, Lab Investigation 81 :189A(2001))。在所有这些模型中, 小鼠发展为肾损伤和纤维化, 能够进展为肾衰竭。对于 COL4A3-/- 小鼠、阿霉素处理的小鼠和单侧输尿管阻塞的小鼠, 在其肾脏的上行小管和下行小管的上皮层中 $\alpha_v\beta_6$ 上调。在多种肾损伤模型中, $\alpha_v\beta_6$ 的表达也可能增加。

[0088] 也能够作为标准体内肿瘤生长和转移模型的这些动物模型中检验抗 $\alpha_v\beta_6$ 单克隆抗体抑制肿瘤生长、进展和转移的能力。参见, 例如, Rockwell 等人, J. Natl. Cancer Inst. 49 :735(1972) ;Guy 等人, Mol. Cell Biol. 12 :954(1992) ;Wyckoff 等人, Cancer Res. 60 :2504(2000) ;和 Oft 等人, Curr. Biol. 8 :124(1998)。癌症中重要的 $\alpha_v\beta_6$ 配体可能包括与转移有关的 TGF- β (综述见 Akhurst 等人, Trends in Cell Biology 11 :S44-S51(2001))、纤连蛋白和玻连蛋白。

[0089] 本发明的治疗的效能可以用多种可以获得的诊断方法检验, 包括身体检查、血液检查、蛋白尿测定、肌酐水平和肌酐清除率、肺功能检查、血浆尿素氮 (BUN) 水平、瘢痕或纤维化损伤的观察和评分、胞外基质 (如胶原蛋白、平滑肌肌动蛋白和纤连蛋白) 的沉积、肾功能检查、超声波、磁共振成像 (MRI) 和 CT 扫描。

[0090] 药物组合物

[0091] 本发明的药物组合物包含一种或多种本发明的抗体, 或其药学可接受的衍生物, 任选地含有任何一种药学可接受的载体。如此处所用的术语“载体”包括已知的可接受的佐剂和载体。

[0092] 根据本发明, 药物组合物可以是无菌注射制剂的形式, 例如无菌注射用水或油悬液。该悬液可以根据本领域公知的技术用适当的分散剂、湿润剂和悬浮剂配制而成。

[0093] 本发明的药物组合物可以按需要口服、局部、静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内、髓内、关节内、滑液内、胸骨内、鞘内、肝内或颅内施用, 或者只是在炎症或肿瘤生长部位局部施用。本发明的药物组合物也可以通过使用如喷雾器、干粉吸入器或计量剂量吸入器吸入施用。

[0094] 可有效产生希望的效应的本发明之抗体的剂量和剂量率取决于多种因素, 如所治疗的疾病的性质、受试者的体重、治疗目的、使用的具体药物组合物和主治医生的判断。约 0.001- 约 100mg/kg 体重每天, 例如约 0.1- 约 50mg/kg 体重每天的活性成分化合物的剂量水平是有用的。例如, 本发明的抗体将以 1-14 天的间隔, 以约 0.01mg/kg 体重 / 天到约 20mg/kg 体重 / 天, 例如约 0.1mg/kg 体重 / 天到约 10mg/kg 体重 / 天的剂量施用。在另一个实施方案中, 当抗体腹膜内施用时, 以约 0.3-1mg/kg 体重的剂量施用。在另一个实施方案中, 当抗体静脉内施用时, 以约在 5-12.5mg/kg 体重的剂量施用。在一个实施方案中, 抗体组合物以有效产生至少 1mg/ml 的血浆抗体水平的量施用。

[0095] 诊断方法

[0096] 本发明的抗体能够用来诊断与 $\alpha_v\beta_6$ 表达水平改变有关的疾病。来自受试者的组织标本, 如组织活检、体液标本或灌洗液 (如肺泡灌洗液), 可以通过使用这些抗体的抗原捕获测定、ELISA、免疫组化测定等来检测。来自正常个体的组织标本作为对照。

[0097] 除非另外指出,本发明的实施将使用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、微生物学、重组DNA、蛋白化学和免疫学常规技术,这些技术属于本领域的技能。这些技术在文献中描述。参见,例如《分子克隆:实验室指南》,第二版(Sambrook等人编),1989;《寡核苷酸合成》(M. J. Gait 编),1984;授予Mullis等人的美国专利4,683,195;《核酸杂交》(B. D. Hames和S. J. Higgins),1984;《转录和翻译》(B. D. Hames和S. J. Higgins),1984;《动物细胞培养》(R. I. Freshney 编),1987;《固定的细胞和酶》,IRL Press,1986;《分子克隆实用指南》(B. Perbal),1984;《酶学方法》,第154和155卷(Wu等人编),Academic Press,纽约;《用于哺乳动物细胞的基因转移载体》(J. H. Miller和M. P. Calos 编),1987;《细胞和分子生物学中的免疫化学方法》(Mayer和Walker 编),1987;《实验免疫学手册》,第I-IV卷(D. M. Weir和C. C. Blackwell 编),1986;《小鼠胚胎的操作》,1986。

[0098] 除非另外定义,在此使用的所有技术和科学术语均与本发明所属领域的技术人员通常理解的含义相同。典型的方法与材料在下文中描述,但是与此处所述相似或相当的方法与材料也能够在本发明的实施中使用。此处提到的所有公开文本和其它参考文献在此全文引用作为参考。如果冲突,以本说明书,包括定义,为准。材料、方法和实施例只是说明性的,而非意在限制。在本说明书中,单词“包含”或其时态变化意味着包含所述整体或整体组,但是并不排除其它任何整体或整体组。

实施例

[0099] 下列实施例旨在说明本发明的方法与材料。在抗体领域通常遇到的,本领域技术人员公知的,所述条件和参数的适当修改和改变,在本发明的精神和范围之内。

[0100] 在下列实施例中, β_6 -/-小鼠如Huang等人,J. Cell Biol. 133:921(1996)所述产生。重组人LAP购自R&D Systems(Minneapolis,MN)。抗体10D5购自Chemicon(Temecula,CA)。L230杂交瘤购自ATCC,分泌的抗体通过在固定的蛋白A上亲和层析从饱和培养物的上清液中纯化。抗体的同种型分型用ISOSTRIP试剂盒(Roche Diagnostics)根据厂商说明书进行。 β_6 转染的SW480细胞系如Weinacker等人,J. Biol. Chem. 269:6940-6948(1994)所述制备。

[0101] 实施例1: β_6 转染的稳定细胞系的产生

[0102] β_6 转染的NIH 3T3和FDC-P1细胞如下产生:用含有全长鼠 β_6 cDNA和新霉素选择性标记的DNA构建体电穿孔亲本细胞系。稳定转染的细胞如下筛选:在含有G418的培养基中传代细胞14天,随后通过荧光激活细胞分选(FACS)分离表达最高水平的表面 β_6 的细胞。转染的FDC-P1细胞在DMEM中培养,其中补充了4mM L-谷氨酰胺,调节为含有1.5g/L碳酸氢钠、4.5g/L葡萄糖和1.0mM丙酮酸钠、10% FBS、2.5%小鼠IL-3培养添加物和1.5mg/ml活性G418。转染的NIH 3T3细胞在补充了10% FBS、2mM L-谷氨酰胺、青霉素/链霉素和1mg/ml活性G418的DMEM中培养。

[0103] 实施例2:可溶性人 $\alpha_v\beta_6$ 的纯化

[0104] $\alpha_v\beta_6$ 蛋白质基本如上文的Weinacker所述纯化。培养一种表达hs $\alpha_v\beta_6$ 的CHO细胞系,离心收集获得的上清液。使用抗 α_v 抗体L230通过亲和层析纯化整联蛋白。纯化的L230与CNBr激活的Sephrose 4B(Sigma)以4.8mg抗体/ml树脂的比例交联。 $\alpha_v\beta_6$ 上清液以0.5mg抗体/ml树脂的比例加到L230亲和柱上,用10倍体积的下列每种溶液洗

柱：(1)50mM Tris-Cl, pH 7.5, 1M NaCl, 1mM MgCl₂; (2)50mM Tris-Cl, pH 7.5, 50mM NaCl, 1mM MgCl₂; 和 (3)10mM Na₃PO₄, pH 7.0。hs $\alpha_v\beta_6$ 用 100mM 甘氨酸, pH 2.5 洗脱到 1 : 10 体积的 1M Na₃PO₄, pH 8.0 内。蛋白质对磷酸缓冲液 (PBS) 透析, 期间更换几次 PBS, 贮存于 -20℃。

[0105] 实施例 3 : β_6 -/- 小鼠的免疫

[0106] β_6 -/- 小鼠通过腹膜内 (IP) 注射在完全弗氏佐剂 (CFA) 中乳化的 25 μ g 纯化重组人 $\alpha_v\beta_6$ 而免疫, 其体积比为 1 : 1, 总体积为 200 μ l。此外, β_6 -/- 小鼠也通过 IP 注射 4×10^6 β_6 转染的 NIH 3T3 细胞而免疫, 这些细胞重悬浮于补充了 1mg/ml CaCl₂ 和 1mg/ml MgCl₂ 的 100 μ l PBS 中, 同一小鼠也在相邻部位注射 100 μ l CFA。开始免疫 2 周和 4 周后, 用相同的试剂类似地加强免疫小鼠, 不同之处是使用不完全弗氏佐剂代替 CFA。小鼠在最后一次加强 7 天后采血, 根据血清与纯化的重组人 $\alpha_v\beta_6$ 或与 β_6 转染的细胞的结合, 测定抗 β_6 滴度。对于用纯化的重组人 $\alpha_v\beta_6$ 免疫的小鼠, 使小鼠休息 3 个月, 用与 ImmunEasy (Qiagen) 混合的相同抗原再次免疫。在为了杂交瘤融合分离脾脏前 3 天, 通过 IP 和静脉内注射, 用 12.5 μ g 纯化的重组人 $\alpha_v\beta_6$ 蛋白免疫小鼠。在融合当天, 杀死动物, 取出脾脏, 制成单细胞悬液。脾细胞通过与可药物选择的细胞融合配偶体融合而成为无限增殖的。

[0107] 实施例 4 : 杂交瘤的筛选

[0108] 通过 β_6 -/- 小鼠的免疫产生两组抗体。一组抗体通过用截短的可溶性人 $\alpha_v\beta_6$ (融合 #6) 免疫产生。另一组抗体通过用鼠 β_6 转染的 NIH 3T3 细胞 (融合 #7) 免疫产生。抗 $\alpha_v\beta_6$ 抗体的筛选用如下所述的基于细胞的和无细胞的结合和功能测定进行。阳性克隆的最初筛选是基于与纯化的 hs $\alpha_v\beta_6$ 和 β_6 转染的人和鼠细胞的结合 (未转染的细胞作为对照)。使选择的克隆扩增, 利用细胞捕获试验再次评价终培养物与 β_6 转染的和未转染的细胞的结合 (实施例 5b, 同上) (图 1A 和 1B 显示的代表性实施例, 其中省略了 mAb 名称的前缀 “6.” 或 “7.”, 它们分别是指融合 6 和融合 7; 参见下表 2)。某些抗体偏爱结合 β_6 转染的细胞, 而有些与转染的和未转染的细胞都结合, 表明只有一个亚类的抗体具有 β_6 偏好性 (图 1A 和 1B)。进一步的筛选是基于抗体阻断生物素化的 hs $\alpha_v\beta_6$ 和 β_6 转染的鼠细胞与 LAP 结合的能力。使用 FACS 亚克隆选择的克隆, 冻存到使用前。

[0109] 根据与 $\alpha_v\beta_6$ 结合的特异性筛选单克隆抗体, 这是基于它们结合 β_6 转染的细胞而不结合未转染的亲本细胞的能力。根据它们不能与表达 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_8$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_1$ 或 $\alpha_5\beta_1$ 的细胞系结合, 这些单克隆抗体进一步被证实为 $\alpha_v\beta_6$ 而不是其它 α_v 整联蛋白或非特异性整联蛋白 (即与含 RGD 的配体结合的非 α_v 整联蛋白) 的特异结合剂。其中包括稳定转染的细胞以及未转染的 JY、K562、SW480、NIH 3T3 和 FDCP1 细胞系。

[0110] 已经由 ATCC 保藏的其中一些抗体在下面表 1 中列出。

[0111] 表 1 保藏的杂交瘤

[0112]

杂交瘤克隆	ATCC 号	保藏日期
6. 1A8	PTA-3647	2001 年 8 月 16 日
6. 2B10	PTA-3648	2001 年 8 月 16 日
6. 3G9	PTA-3649	2001 年 8 月 16 日
6. 8G6	PTA-3645	2001 年 8 月 16 日
6. 2B1	PTA-3646	2001 年 8 月 16 日
6. 2A1	PTA-3896	2001 年 12 月 5 日

6. 2E5	PTA-3897	2001 年 12 月 5 日
7. 1G10	PTA-3898	2001 年 12 月 5 日
7. 7G5	PTA-3899	2001 年 12 月 5 日
7. 1C5	PTA-3900	2001 年 12 月 5 日

[0113] 实施例 5 :用于筛选和表征的试验

[0114] a. $\alpha_v \beta_6$ ELISA

[0115] 一块 96 孔微孔板 (Corning COSTAR EASY-WASH) 用 $50 \mu\text{l}$ /孔 $50 \mu\text{g/ml}$ $\text{hs} \alpha_v \beta_6$ 在 4°C 下包被过夜。平板在自动洗板机中用洗涤缓冲液 (0.1% TWEEN-20, 溶于 PBS) 洗涤 4 次。然后加入 $180 \mu\text{l}$ /孔溶于 TBS 的 3% BSA, 在 25°C 下温育 1 小时以阻断非特异性结合。平板如上所述洗涤, 加入 ($50 \mu\text{l}$ /孔) 杂交瘤上清液 (用于筛选试验) 或纯化的抗体 (用于表征) 在含有 1mg/ml BSA, 1mM CaCl_2 和 1mM MgCl_2 的 TBS 中的稀释液。平板在 25°C 下温育 1 小时, 洗涤, 然后与 $50 \mu\text{l}$ /孔过氧化物偶联的山羊抗小鼠 IgG+A+M 抗体 (Cappel) 温育 1 小时。用 $3,3',5,5'$ -四甲基联苯胺 (TMB) 检测结合的抗体。结合用 450nm 测量的吸光度表示。

[0116] b. 细胞捕获试验

[0117] 一块 96 孔微孔板用 $50 \mu\text{l}$ /孔第二抗体 (驴抗小鼠 IgG (Jackson ImmunoResearch); $5 \mu\text{g/ml}$, 在 pH 9.2 的 50mM 碳酸氢钠中稀释) 在 4°C 下包被过夜。平板用 $100 \mu\text{l}$ /孔测定缓冲液 (RPMI+ 2% BSA) 洗涤两次, 然后用 $100 \mu\text{l}$ /孔测定缓冲液在 37°C 下封闭 1 小时。对于 FDC-P1 细胞和 β_6 转染的 FDC-P1 细胞, 平板用抗小鼠 IgG (Jackson ImmunoResearch; $20 \mu\text{g/ml}$) 在室温下封闭 10 分钟, 以降低第二抗体的非特异性 Fc 受体结合 (其它细胞型省略)。封闭平板时, 细胞在测定缓冲液中以 5×10^6 细胞/ ml 的浓度用 $2 \mu\text{M}$ 荧光染料 (钙黄绿素-AM, Molecular Probes) 标记。细胞与染料在测定缓冲液中以 37°C 水浴和轻轻振摇下温育 15 分钟, 离心收集, 重悬浮于测定缓冲液中至 5×10^6 细胞/ ml 。在封闭步骤后, 通过拍打平板弃去缓冲液, 向平板中加入 $25 \mu\text{l}$ /孔的上清液或纯化的抗体。在 37°C 下温育 15 分钟, 之后加入 $25 \mu\text{l}$ /孔标记的细胞, 平板在 37°C 下温育 1 小时。平板用测定缓冲液 ($100 \mu\text{l}$ /孔) 洗涤 3-5 次, 记录平板上捕获的细胞发出的荧光。通过比较最后一个洗涤步骤之前的荧光 (即添加的总细胞) 与洗涤后的荧光 (即结合的细胞), 测定结合百分比。

[0118] c. FACS

[0119] 通过胰蛋白酶消化收集细胞, 用 PBS 洗涤一次, 然后重悬浮于 FACS 缓冲液 ($1 \times \text{PBS}$, 2% FBS, 0.1% NaN_3 , 1mM CaCl_2 和 1mM MgCl_2) 中。 0.2×10^5 细胞然后在 FACS 缓冲液中以冰上温育 1 小时, 该缓冲液中含有杂交瘤上清液, 总体积为 $100 \mu\text{l}$ 。温育后, 细胞用冰冷的 FACS 缓冲液洗涤两次, 重悬浮于 $100 \mu\text{l}$ 含有 $5 \mu\text{g/ml}$ 驴抗小鼠 IgG PE (Jackson ImmunoResearch) 的 FACS 缓冲液中, 在冰上温育 30 分钟。细胞然后用冰冷的 FACS 缓冲液洗涤两次, 重悬浮于 $200 \mu\text{l}$ FACS 缓冲液中。通过流式细胞分析监测 PE 标记的第二抗体的结合。

[0120] d. 生物素- $\text{hs} \alpha_v \beta_6$ 与 LAP 的结合

[0121] 96 孔微孔板 (Corning COSTAR EASY-WASH) 用在 PBS 中稀释的 $0.3 \mu\text{g/ml}$ 重组人 LAP (R&D Systems, Cat. #246-LP) ($50 \mu\text{l}$ /孔) 在 4°C 下包被过夜。除去包被溶液后, 平板用 $180 \mu\text{l}$ /孔 3% BSA/TBS 在 25°C 下封闭 1 小时。在另外一块 96 孔圆底平板上, $60 \mu\text{l}$ /

孔 2× 贮存液 (0.5 μg/ml (1.25nM) 生物素- $\alpha_v\beta_6$, 2mM CaCl_2 和 2mM MgCl_2 , 溶于含有 1mg/ml BSA 的 TBS) 与 60 μl/孔杂交瘤上清液 (用于筛选) 或纯化的抗体 (也溶于含有 1mg/ml BSA 的 TBS) 的 2× 原液混合, 并在 25℃ 下温育 1 小时。LAP 包被的平板用自动洗板机用洗涤缓冲液 (0.1% TWEEN-20, 溶于 PBS) 洗涤 4 次, 之后将 100 μl 抗体- $\alpha_v\beta_6$ 混合物转移到平板上, 在 25℃ 下温育 1 小时。平板如上所述洗涤, 与 50 μl/孔 extravidin- 辣根过氧化物酶偶联物 (Sigma) 在 TBS (1mg/ml BSA) 中的 1 : 1000 稀释液在 25℃ 下温育 1 小时。结合的蛋白质用 TMB 底物检测。

[0122] e. β_6 -FDC-P1 细胞与 LAP 的粘附

[0123] 96 孔微孔板 (Corning COSTAR EASY-WASH) 用 50 μl/孔在 50mM 碳酸氢钠, pH 9.2 中稀释的 0.5 μg/ml 重组人 LAP (R&D Systems) 在 4℃ 下包被过夜。平板用 PBS (100 μl/孔) 洗涤两次, 用溶于 PBS 的 1% BSA (100 μl/孔) 在 25℃ 下封闭 1 小时。平板用 100 μl/孔测定缓冲液 (TBS 完全溶液加 1mM CaCl_2 和 1mM MgCl_2) 洗涤两次。然后, 向平板的各个孔中加入 25 μl 杂交瘤上清液 (或纯化的抗体) 和 25 μl β_6 -FDC-P1 细胞 (5×10^6 细胞/ml, 如上所述用钙黄绿素 AM 标记)。平板在 25℃ 下温育 1 小时, 然后用测定缓冲液 (100 μl/孔) 洗涤 4-6 次。记录在平板上捕获的细胞发出的荧光。通过比较最后一个洗涤步骤之前的荧光 (即添加的总细胞) 与洗涤后的荧光 (即结合的细胞), 测定结合百分比。

[0124] f. TGF- β 生物测定

[0125] 此处使用的 TGF- β 生物测定是 Abe 等人, Anal. Biochem. 216 :276-284 (1994) 所述的水貂肺上皮细胞 (MLEC) PAI-1 萤光酶共培养测定的一种变化, 其中 β_6 转染的细胞与报道细胞共培养, 以监测 $\alpha_v\beta_6$ 对 TGF- β 的激活 (Munger, 同上)。这是对 TGF- β 的一种定量生物测定, 是基于它能够诱导纤溶酶原激活物抑制剂 -1 (PAI-1) 表达的能力。在该测定中, MLEC 细胞用一种表达构建体稳定转染, 该构建体含有与萤火虫萤光素酶报道基因融合的截短的 PAI-1 启动子。转染的 MLEC 细胞与活性 TGF- β (0.2 到 > 30pM) 接触导致细胞裂解物中萤光素酶活性依赖于剂量地增加。

[0126] 为了进行该测定, TMLC (水貂肺上皮细胞系 Mv 1 Lu) 细胞用 PAI-1-萤光素酶构建体转染。转染的细胞在含有 L-Gln、Pen/Strep 和 200 μg/ml G418 的 DMEM+10% FBS 中培养。用整联蛋白 β_6 构建体转染的 SW480 细胞 (“ β_6 -SW480”或“SW480 β_6 ”细胞) 在含有 L-Gln 和 Pen/Strep 的 DMEM+10% FBS 中培养。从含有 PBS+5mM EDTA 的摇瓶中挑取细胞, 用 PBS+0.5% BSA 洗涤, 用血细胞计数器计数, 接种于 96 孔板中。SW480- β_6 细胞在洗涤缓冲液中以 4×10^4 细胞/孔接种。单克隆抗体用 DMEM (无血清) 稀释, 加到 SW480- β_6 细胞中, 在室温下预温育 20 分钟。然后以 2×10^4 细胞/孔加入 TMLC 细胞至终体积为 100 μl。平板在潮湿、富含 CO_2 的孵箱中温育 20 小时。弃去平板的上清液, 替换为 100 μl PBS+1mM Ca^{2+} 和 1mM Mg^{2+} 。然后裂解平板上的细胞, 用发光型反应 Packard LUCLITE 试剂盒 (#6016911) 和 TROPIX 微孔板光度计检测萤光素酶活性水平。

[0127] 实施例 6 : 抗体的纯化

[0128] 选择 8 个来自融合 #6 的杂交瘤克隆 (用前缀“6.”表示) 和 14 个来自融合 #7 的杂交瘤克隆 (用前缀“7.”表示) 进一步放大并表征 (表 2)。

[0129] 制备每种杂交瘤的小规模培养物 (150ml), 离心收集上清液。利用蛋白 A 亲和层析从这些上清液中纯化抗体。对于 IgG_{2a} 同种型抗体, 直接将上清液加到蛋白 A Sepharose 4

Fast Flow(Amersham Pharmacia Biotech, AB, Uppsala,瑞典) 上(1ml 沉积床体积)。用 PBS 洗柱, IgG 级分用 25mM 磷酸, 100mM NaCl, pH 2.8 洗脱到 1 : 20 体积的 0.5MNa₃PO₄, pH 8.6 中。对于鼠 IgG₁ 抗体, 在上样前将上清液调节为 1.5M 甘氨酸, 3M NaCl, pH 8.9, 在洗脱前用 25mM Na₃PO₄, 3M NaCl, pH8.6 洗柱。用这些制品进行此处所述的体外生物化学表征。

[0130] 表 2 杂交瘤克隆的表征

[0131]

克隆名称	克隆号	同种型	阻断剂*
6.1A8	2	IgG2a	Y
6.2B10	10	IgG2a	Y
6.3G9	25	IgG1	Y
6.4B4	30	IgG1	N
6.6B5	46	IgG1	N
6.8B4	55	IgG1	N
6.8G6	56	IgG1	Y
6.2B1	85	IgG1	Y
7.1C5	2	IgG2a	Y
7.1G10	5	IgG2a	Y
7.2A1	6	IgG2a	Y
7.2F5	11	IgG2a	Y
7.2H2	12	IgG2a	Y
7.4A3	17	IgG2a	Y
7.7G5	32	IgG1	Y
7.8H12	39	IgG2a	Y
7.9D4	40	IgG2a	N
7.9G8	41	IgG2a	Y
7.9H5	43	IgG2a	Y
7.10D7	44	IgG2a	Y
7.10H2	46	IgG2a	Y

[0132] 阻断剂被定义为一种阻断 $\alpha_v\beta_6$ 与 LAP 结合的抗体, 根据配体与纯化的 hs $\alpha_v\beta_6$ 或与表达 β_6 的细胞的结合测定。

[0133] 为了在动物模型中使用, 杂交瘤克隆放大为 2L 培养基, 在 Lifecell Culture Bags-PL732(Nexell, 目录号 R4R2113) 中培养 4 周。首先通过如上所述的蛋白 A 亲和层析, 随后通过 Q Sepharose(Amersham Pharmacia) 上的离子交换步骤, 纯化杂交瘤产生的抗体。用 2M Tris 碱将蛋白 A 层析步骤获得的洗脱液调节为 pH 8.6, 用水稀释 10 倍, 加到用 10mM Na₃PO₄, 25mM NaCl, pH 8.6 平衡的 Q Sepharose 柱上 (20mg 蛋白质 /ml 树脂)。用 5 倍柱体积的平衡缓冲液洗柱, 用 25mM Na₃PO₄, 150mM NaCl, pH 7.2 洗脱结合的蛋白质。无菌过滤 (0.45 μ m) 洗脱的蛋白质, 贮存于 -70℃ 直到使用。

[0134] 实施例 7: 纯化的抗体的表征

[0135] 对以下方面定量表征纯化的抗体 (表 2, 同上): 它们在 MLEC 测定 (同上) 中 (1) 结合 hs $\alpha_v\beta_6$, (2) 结合 β_6 转染的 SW480 和 FDC-P1 细胞, (3) 抑制生物素 - $\alpha_v\beta_6$ 与 LAP 结合, (4) 抑制 β_6 转染的 FDC-P1 细胞与 LAP 结合, 和 (5) 阻断 $\alpha_v\beta_6$ -介导的 TGF- β 激活的能力。每种测定的相对效能与已知的 $\alpha_v\beta_6$ 抗体 10D5(Huang 等人, J. Cell Sci. 111: 2189(1998)) 相比较, 在有些情况下, 与抗 α_v - 抗体 L230 相比较。为了表征融合 #7 抗体, 融合 #6 抗体 6.8G6 也作为阳性对照。

[0136] 在 1mM Ca²⁺ 和 1mM Mg²⁺ 存在下进行的一项最初的结合实验 (实施例 5a, 同上)

表明大多数纯化的抗体与 $hs\alpha_v\beta_6$ 结合（图 2A 和 2B）。然而意外的是，对于 10D5 和克隆 7. 2F5 和 7. 10D7 没有观察到结合。随后的一项实验表明，10D5（图 3E）、7. 2F5 和 7. 10D7 的结合只被 Ca^{2+}/Mg^{2+} 较弱地支持，但是 1mM $MnCl_2$ 更强。在这些新克隆中，有三个（6. 1A8（图 3A）、7. 7G5 和 6. 8G6（图 3C））显示需要二价阳离子，但是 Ca^{2+}/Mg^{2+} 态和 Mn^{2+} 结合态没有观察到不同。

[0137] 其余的克隆显示不需要二价阳离子，即在 10mM EDTA 存在下能够与抗原结合（图 3B、3D 和 3F）。FACS 分析可与 β_6 转染的 NIH 3T3 细胞或 SW480 细胞结合的抗体显示一种类似的模式，不同之处是在本文中，10D5 在 Ca^{2+}/Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 态时相同地结合。与可溶性 $\alpha_v\beta_6$ 结合的需要可能不同于与细胞表面表达的 $\alpha_v\beta_6$ 结合的需要，因为蛋白质构象或亲合力效应不同。

[0138] 这些结果提示，这组中至少有 3 个不同类别的 β_6 阻断抗体。其中一类（10D5）可区别 Ca^{2+}/Mg^{2+} 与 Mn^{2+} 条件。另一类（包括 6. 1A8、7. 7G5 和 6. 8G6）需要阳离子，但是不能区别 Ca^{2+}/Mg^{2+} 与 Mn^{2+} 。最后一类（包括抗 α_v 抗体 L230、6. 2B10、6. 3G9（图 3B）和 6. 2B1（图 3D）、7. 1C5 和 7. 1G10）是不依赖阳离子的。

[0139] 然后评价纯化的抗体抑制 $\alpha_v\beta_6$ -LAP 相互作用的能力。在上文所述的实施例 5d 的无细胞测定中，抗体 6. 1A8、6. 2B1、6. 3G9 和 6. 8G6 显示低于 10D5 的 IC_{50} 值（图 4A；表 3）。6. 2B10 显示较高的 IC_{50} ，但是仍然产生完全抑制（图 4A）。6. 4B4 只显示部分抑制，而 6. 6B5 和 6. 8B4 不显示抑制（图 4A）。利用同一测定系统，抗体 7. 1C5、7. 1G10、7. 2A1、7. 4A3、7. 7G5、7. 9G8、7. 9H5 和 7. 10H2 显示低于 10D5 的 IC_{50} 值（图 4B；表 3）。抗体 7. 2F5、7. 2H2 和 7. 8H12 显示几乎相同的或较高的 IC_{50} 值，并且仍然产生完全抑制（图 4B）。

[0140] 在上文实施例 5e 所述的细胞测定中观察到相似的趋势，例外的是 6. 1A8、6. 2B10 和 7. 9D4，它们对细胞的效能低于对纯化的蛋白质的效能（图 5A-E；表 3）。

[0141] 总之，这些结果表明，我们已经成功产生了可特异性抑制人和鼠 $\alpha_v\beta_6$ 与 LAP 相互作用的抗体。一些这样的抗体以高亲和力结合 $\alpha_v\beta_6$ （表观 Kd' s ≥ 0.3 nM，通过流式细胞术测定），抑制 β_6 转染的细胞与 LAP 的结合， $IC_{50} \geq 0.05$ nM (8ng/mL)，并且阻止 $\alpha_v\beta_6$ 介导的 TGF- β 1 的激活， $IC_{50} \geq 0.58$ nM (87ng/mL)。

[0142] 最后，利用 PAI-1/ 萤光素酶报道基因测定（实施例 5f，同上）评价纯化的抗体阻断 $\alpha_v\beta_6$ 介导的 TGF- β 激活的能力。6. 3G9、6. 8G6、6. 2B1、7. 1G10 和 7. 7G5 再次能够抑制 $\alpha_v\beta_6$ 介导的 TGF- β 的激活， IC_{50} 值低于 10D5，而在该测定中其余的抗体似乎有效性显著较低（图 6A 和 6B；表 3）。因此，阻断 $\alpha_v\beta_6$ 与 LAP 相互作用的能力与在体外抑制 TGF- β 激活的能力相关。

[0143] 表 3 杂交瘤克隆的表征

[0144]

克隆名称	克隆编号	$\alpha_v\beta_6$ - 结合 ELISA EC50 (ng/ml)	$\alpha_v\beta_6$ -LAP 阻断 IC50 (ng/ml)	FDCP1-LAP 阻断 IC50 (ng/ml)	PAI-1 荧光素酶 IC50 (ng/ml)
6.2B1	85	34.7	225	8	87
6.3G9	25	76.7	271	17	375
6.8G6	56	17.5	169	23	312
10D5	-	-	605	50	2070
6.1A8	2	3.7	179	2520	~40,000
6.2B10	10	78.9	1950	>30,000	>40,000
6.4B4	30	25.4	>50,000	>30,000	>40,000
6.6B5	46	17.1	>50,000	>30,000	>40,000
6.8B4	55	94.4	>50,000	>30,000	>40,000
L230	-	27.1	229	n.t.**	n.t.
7.1G10	5	4.2	113	30	250
7.7G5	32	13.0	155	51	700
7.1C5	2	2.5*	80*	83	n.t.
7.2A1	6	5*	300*	101	n.t.
10D5	-	43*	377	n.t.	2,000
7.4A3	17	5.7	204	67	3,500
7.10H2	46	6.6	254	63	3,500
7.2H2	12	9.3	370	106	5,500
7.9H5	43	7.3	230	55	7,000
7.9G8	41	6.2	264	284	>20,000
7.8H12	39	46.0	1140	969	>20,000
7.2F5	11	>5000	529	1490	>20,000
7.9D4	40	1.7	不完全	>10,000	>20,000
7.10D7	44	>5000	3000*	1120	n.t.

[0145] * :数据来自不同的实验。

[0146] ** :未检测。

[0147] *** :表 3 总结的所有实验均在 1mM Ca^{2+} 和 1mM Mg^{2+} 存在下进行。

[0148] **** :以黑体字表示的抗体是现有技术中的抗体 10D5 和 L230,以及对 $\alpha_v\beta_6$ 有特别高的抑制能力的新抗体。

[0149] 然后,利用一种动力学排除试验 (KinExA) 测定 6.3G9 和 6.8G6 对可溶性 $\alpha_v\beta_6$ 的

溶液亲和力。可溶性整联蛋白的一系列稀释液 ($1 \times 10^{-8} \text{M}$ 到 $2.4 \times 10^{-12} \text{M}$) 与 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 抗体温育 3 小时。然后使用 KinExA 仪器 (Sapidyne Instruments, Inc., Boise, Idaho), 使这些样品通过用整联蛋白包被的聚甲基丙烯酸甲酯珠。对于 6.8G6, 温育和测定缓冲液中包含 1mM CaCl_2 和 1mM MgCl_2 。结合的和游离的抗体的含量用 Cy5- 标记的抗小鼠第二抗体测定。用 KinExA 软件进行二次曲线拟合, 以获得每个相互作用的解离常数 (K_d)。用该方法测定的 K_d 's 是, 6.3G9 为 15.6pM , 6.8G6 为 22.8pM (图 9A 和 9B)。因此, 这两种抗体对 $\alpha_v \beta_6$ 都有极高的亲和力。

[0150] 我们进一步鉴定了可识别整联蛋白的“激活”状态的抗 $\alpha_v \beta_6$ 抗体的类别。 $\alpha_v \beta_6$ 有两种可能的激活状态。第一种状态, 激活的整联蛋白被定义为对其配体有较高的亲和力。在活化的阳离子如 1mM MnCl_2 存在下, 对于这种激活状态特异的抗体显示与整联蛋白的结合增强。通过流式细胞分析比较 1mM MnCl_2 和 1mM MgCl_2 (未活化的阳离子) 中的结合程度, 表明此处所述的某些 $\alpha_v \beta_6$ 抗体, 包括 6.1A8 和 6.6B5, 在 MnCl_2 存在下显示显著增强的结合。

[0151] 对于 $\alpha_v \beta_6$ 的第二种激活状态, 如上所述该整联蛋白能够激活潜伏的 $\text{TGF-}\beta$ 。准备表达截短的 $\alpha_v \beta_6$ 的一种细胞系 (SW480 ($\beta 6-770\text{T}$))。在 TMLC 萤光素酶测定 (Munger 等人, 同上) 中, 该细胞系能够结合 LAP, 但是不能激活 $\text{TGF-}\beta$ 。因此, 可与全长 β_6 转染的 SW480 细胞结合、但是不与 770T 截短的转染细胞结合的抗体, 对于能够激活 $\text{TGF-}\beta$ 的 $\alpha_v \beta_6$ 形式是特异的。抗体 7.8B3 和 7.8C9 满足这一标准。

[0152] 实施例 8: 根据抗体竞争的表位作图

[0153] 也用 ELISA 形式检测了纯化的单克隆抗体与 6.8G6 竞争结合生物素化 $\alpha_v \beta_6$ 的能力。在该测定中, 6.8G6 包被于 ELISA 板上, 向含有各 1mM Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的缓冲液中加入竞争抗体与生物素化 $\alpha_v \beta_6$ 的混合物。结合的整联蛋白用 extravidin-HRP 偶联物检测, 根据竞争性抗体阻断结合的能力对其评分。除了 6.2B10 (一种弱阻断剂) 以外, 所有共同阻断剂 (表 2) 都显示能够与 6.8G6 不同程度地竞争 (表 4)。这些数据证实, 这些共同阻断剂可结合与 6.8G6 相同或重叠的表位。

[0154] 表 4 根据抗体竞争的表位作图的表

[0155]

克隆	共同阻断剂?	与 6.8G6 的竞争
6.2A1	N	-
6.4B4	N	-
6.6B5	N	-
6.8B4	N	-
7.9D4	Y/N	-
10D5	Y	++
L230	Y	++
6.1A8	Y	++
6.2B10	Y (弱)	-
6.3G9	Y	+
6.8G6	Y	++
6.2B1	Y	++
7.1C5	Y	+++
7.1G10	Y	+++
7.2A1	Y	++
7.2F5	Y	++
7.2H2	Y	++
7.4A3	Y	++
7.7G5	Y	++
7.8H12	Y	++
7.9G8	Y	++
7.9H5	Y	++
7.10D7	Y	+
7.10H2	Y	++

[0156] 利用 ELISA 检测纯化的单克隆抗体与生物素化 6.3G9 或生物素化 6.8G6 竞争结合 $\alpha_v\beta_6$ 的能力。在该测定中,未标记的 $\alpha_v\beta_6$ 包被于 ELISA 板上,向含有各 1mM Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的缓冲液中加入竞争抗体与生物素化抗体的混合物。利用 neutravidin-HRP 偶联物检测结合的生物素化抗体。数据表明,最强的阻断抗体(例如 6.2B1、7.1C5 和 7.1G10)与 6.3G9 和 6.8G6 竞争结合 $\alpha_v\beta_6$ (表 4.1,图 10A 和 10B)。抗体 6.1A8 和 7.7G5 显示较低的竞争性,这可能是由于它们对 $\alpha_v\beta_6$ 的亲和力较低。在该测定中,非阻断抗体或抗 α_v 抗体 L230 都不显示与 6.3G9 或 6.8G6 有任何竞争。这些结果表明, $\alpha_v\beta_6$ 特异的阻断抗体可结合与 $\alpha_v\beta_6$ 相同或重叠的表位。

[0157] 表 4.1 根据抗体竞争的表位作图的表

[0158]

克隆	共同阻断剂?	与生物素化 6.8G6 的竞争	与生物素化 6.3G9 的竞争
6.3G9	Y	+++	+++
6.2B1	Y	+++	+++
6.8G6	Y	+++	++
7.1C5	Y	+++	+++
7.1G10	Y	+++	+++
7.7G5	Y	++	+
6.1A8	Y	++	+
6.2A1	N	-	-
6.2E5	N	-	-
6.2G2	N	-	-
6.4B4	N	-	-
7.8B3	N	-	-
7.8C9	N	-	-
L230	Y	-	-

[0159] 实施例 9 :CDR 序列

[0160] 如 Coligan 等人 (编著) 的《现代免疫学方法》, Wiley, Media, PA (2001) 所述, 利用标准技术分离并测序某些纯化的单克隆抗体的 cDNA。推断的氨基酸序列在图 7A 和 7B 中显示。

[0161] 如下比较高亲和力结合剂 6. 8G6、6. 1A8、6. 2B1、6. 3G9 和 6. 2A1 和非阻断剂 6. 2G2 的重链 CDR 的氨基酸序列 (破折号表示缺口)。

[0162] CDR1

[0163] 6. 8G6 SYTFTDYAMH (SEQ ID NO :1)

[0164] 6. 1A8 SYTFTDYTMH (SEQ ID NO :2)

[0165] 6. 2B1 GFTFSRYVMS (SEQ ID NO :3)

[0166] 6. 3G9 GFTFSRYVMS (SEQ ID NO :3)

[0167] 6. 2A1 GYDFNNDLIE (SEQ ID NO :49)

[0168] 6. 2G2 GYAFTNYLIE (SEQ ID NO :50)

[0169] CDR2

[0170] 6. 8G6 VISTYYGNTNYNQKFKG (SEQ ID NO :4)

[0171] 6. 1A8 VIDTYYGKTNYNQKFEG (SEQ ID NO :46)

[0172] 6. 2B1 SISSG-GSTYYPDSVKG (SEQ ID NO :5)

[0173] 6. 3G9 SISSG-GRMYYPDTVKG (SEQ ID NO :6)

- [0174] 6. 2A1 VINPGSGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO :51)
- [0175] 6. 2G2 VISPGSGIINYNEKFKG (SEQ ID NO :52)
- [0176] CDR3
- [0177] 6. 8G6 GGLRRGDRPSLRYAMDY (SEQ ID NO :7)
- [0178] 6. 1A8 GGFRRGDRPSLRYAMDS (SEQ ID NO :47)
- [0179] 6. 2B1 GAIYDG-----YYVFAY (SEQ ID NO :8)
- [0180] 6. 3G9 GSIYDG-----YYVFPY (SEQ ID NO :9)
- [0181] 6. 2A1 IYYGPH-----SYAMDY (SEQ ID NO :53)
- [0182] 6. 2G2 ID-YSG-----PYAVDD (SEQ ID NO :54)
- [0183] 在 SEQ ID NO :7 中,以黑体表示的“R”(第 12 个残基)表示其具有多态性,例如可以是 Q。
- [0184] 如下比较这 4 种高亲和力结合剂和非阻断剂 6. 2G2 的轻链 CDR 的氨基酸序列。
- [0185] CDR1
- [0186] 6. 8G6 RASQSVSTSS-YSYMY (SEQ ID NO :10)
- [0187] 6. 1A8 RASQSVSIST-YSYIH (SEQ ID NO :48)
- [0188] 6. 2B1 SASSSVSSS----YLY (SEQ ID NO :11)
- [0189] 6. 3G9 SANSSVSSS----YLY (SEQ ID NO :12)
- [0190] 6. 2A1 KASLDVRTAVA (SEQ ID NO :55)
- [0191] 6. 2G2 KASQAVNTAVA (SEQ ID NO :56)
- [0192] CDR2
- [0193] 6. 8G6 YASNLES (SEQ ID NO :13)
- [0194] 6. 1A8 YASNLES (SEQ ID NO :13)
- [0195] 6. 2B1 STSNLAS (SEQ ID NO :14)
- [0196] 6. 3G9 STSNLAS (SEQ ID NO :14)
- [0197] 6. 2A1 SASYRYT (SEQ ID NO :57)
- [0198] 6. 2G2 SASYQYT (SEQ ID NO :58)
- [0199] CDR3
- [0200] 6. 8G6 QHNWEIPFT (SEQ ID NO :15)
- [0201] 6. 1A8 QHSWEIPYT (SEQ ID NO :16)
- [0202] 6. 2B1 HQWSSYPPT (SEQ ID NO :17)
- [0203] 6. 3G9 HQWSTYPPT (SEQ ID NO :18)
- [0204] 6. 2A1 QQHYGIPWT (SEQ ID NO :59)
- [0205] 6. 2G2 QHHYGPWT (SEQ ID NO :60)
- [0206] 如图 7A 和 7B 所示,属于依赖二价阳离子的类别的单克隆抗体(例如 6. 1A8 和 6. 8G6)在 CDR 内似乎含有非常类似的氨基酸序列,而不依赖二价阳离子的单克隆抗体(例如 6. 2B1 和 6. 3G9)在其 CDR 内含有另外一组基序。
- [0207] 抗 $\alpha_v\beta_6$ 单克隆抗体的效能和特异性可能受微小差异的氨基酸残基控制。对于 6. 1A8 和 6. 8G6,可变域的氨基酸序列非常相似,在重链中含有 10 个氨基酸差异,其中 3 个是保守的,在轻链中含有 11 个氨基酸差异。然而这些抗体在体外测定中有大约 100 倍的活

性差异。氨基酸差异分散在多肽链的整个可变域中,这些残基可以单独起作用,或者与同一链或配偶链上的残基协同起作用,影响抗体的效能。在重链中,7个残基的位置使得它们可能紧密接近 $\alpha_v\beta_6$,或者在与 $\alpha_v\beta_6$ 的结合中起活性作用。

[0208] 在大量整联蛋白结合蛋白质(配体)中发现了一种 RGD 基序。这种基序已经显示通过直接接触整联蛋白上的结合袋可介导它们与整联蛋白的相互作用。因为 RGD 本身在整联蛋白结合蛋白质中相当常见,该基序之外的侧翼残基在使整联蛋白-配体相互作用具有结合特异性方面肯定起作用。在 6.1A8 和 6.8G6 中,一个这样的侧翼残基位于重链的位点 101 处,在 CDR3 内。该氨基酸残基位于 RGD 基序侧翼,可能位于抗原识别位点处,影响结合的效能和特异性。

[0209] 6.1A8 和 6.8G6 的相同重链 CDR 内的其它不同残基包括位点 33(CDR1);位点 52、57 和 65(CDR2);和位点 115(CDR3)处的残基。重链中的另外一个差异位于框架 1 的位点 4 处,靠近 N 端。通过结晶学模型预测该残基折叠接近抗体的 CDR,可能在 $\alpha_v\beta_6$ 结合中起重要作用。6.1A8 与 6.8G6 之间的其余 3 个差异是位点 20(框架 1)、44(框架 2)和 82(框架 3)处的保守差异。

[0210] 不依赖阳离子的抗体的氨基酸序列也是高度同源的。它们能够被分成两类:与含有 RGD 的抗体 6.8G6 竞争的(即 6.2B1、6.3G9、7.10H2、7.9H5、7.1C5、7.1G10 和 7.4A3);和不与之竞争的(即 6.2A1、6.2B10 和 6.4B4)。与 6.8G6 竞争的一类在重链的 CDR3 中含有 FXY 基序,而非竞争的一类不含。这种差异提示,FX Y 基序对于介导与 $\alpha_v\beta_6$ 的不依赖阳离子的结合至关重要。另外,这类含有 FXY 的抗体可能与 $\alpha_v\beta_6$ 上的一个表位结合,该表位与 RGD 结合袋重叠,但是与之不同。抗体 6.2B10 和 6.4B4 不含 FXY 基序,是较差的 $\alpha_v\beta_6$ 阻断剂。它们证实可与 $\alpha_v\beta_6$ I 域样部分结合,定义了可与抗 $\alpha_v\beta_6$ 抗体结合的另外一个表位。有意思的是,单克隆抗体 6.2A1 属于不依赖阳离子的类别,但是与其它不依赖阳离子的单克隆抗体一样,不含 RGD 序列。

[0211] 单克隆抗体 7.7G5 属于依赖阳离子的类别。然而,7.7G5 的轻链序列与不依赖阳离子的 I 域结合抗体 6.2B10 高度同源。7.7G5 的重链在 CDR1 上也类似于不依赖阳离子的抗体。但是其 CDR2 和 CDR3 更类似于依赖阳离子的类别。这一发现提示,特定 CDR 使抗体具有特异性。对于重链的 CDR3 这是特别正确的,这可能是由于抗体该部分内的高度变异性。实际上,3 种依赖阳离子的抗体中的 2 种和 9 种不依赖阳离子的抗体中的 7 种含有重链 CDR3 序列,该序列可能在 $\alpha_v\beta_6$ 识别中起重要作用。众所周知,7.7G5 在其重链 CDR2 中缺乏 RGD 基序,但是含有 XGD 基序。该 XGD 基序可能以类似于 RGD 的方式起作用,并且使 7.7G5 具有结合亲和力/特异性。

[0212] 上述序列检查和据此的推断为合理设计提供特定结合性质的特定可变区氨基酸序列提供了基础。

[0213] 实施例 10:诊断抗体

[0214] 能够检测石蜡包埋组织切片或其它组织标本中的 $\alpha_v\beta_6$ 表达的抗体可以用作诊断剂。例如,这些诊断工具能够用来检测如癌症或纤维化的适应证的组织切片中上调的 $\alpha_v\beta_6$ 。

[0215] 为了鉴定可检测石蜡包埋组织中的 $\alpha_v\beta_6$ 的抗体,我们第一次筛查了一系列用于结合 HPLC 纯化的 β_6 亚基的抗体。可结合该亚基的抗体可能识别线性肽表位,因此预计在

石蜡包埋组织中有较高的成功可能性。使用与测定 $\alpha_v\beta_6$ 结合所述（同上）相同的 ELISA 形式测定与纯化的 β_6 亚基的结合，不同之处在于平板上固定纯化的 β_6 整联蛋白，而不是 $\alpha_v\beta_6$ 蛋白。利用该方法，鉴定了大量能够结合纯化的 $\alpha_v\beta_6$ 蛋白和纯化的 β_6 亚基的融合 6 抗体。见上文中的表 5，其中省略克隆名称的前缀“6.”。

[0216] 表 5 可与纯化的 $\alpha_v\beta_6$ 或纯化的 β_6 亚基结合的抗体

[0217]

克隆名称	与 $\alpha_v\beta_6$ 结合	与 HPLC 纯化的 β_6 亚基结合
1A1	+	6
1A8	+	-
1A11	+	+
1E1	+	+
1E6	+	+
1H10	+/-	-
2A1	+	+
2A10	-	-
2B8	-	-
2B10	+	-
2C4	+	+
2C7	+	+
2E5	+	+
2G3	+	-
3A6	+	-
3B1	+	-
3B2	+	+
3B11	+	+
3C2	+	+
3D5	+	-
3D10	+	+
3F1	+	-
3G3	-	-
3G5	+	-
3G9	+	-
3H2	+	-
3H11	+	-
4A4	+/-	+
4B2	+	-
4B4	+	-
4B10	+	-
4D2	+	-
4E4	+	+
4G3	+	-
4G4	+	+
4H4	+	+
4H12	+	-
5A2	+	-
5B6	+	+
5D6	+	+
5D8	-	-

[0218]

克隆名称	与 $\alpha_v\beta_6$ 结合	与 HPLC 纯化的 β_6 亚基结合
5G9	+	+
5G10	+	+
5H3	+	+
6B1	+	+
6B5	+	+
6C4	+	-
6D12	+	+
6E6	+	-
6E10	+	-
6G3	+/-	-
7C7	+	+
7E5	+	-
7F8	+	-
8B4	+	+
8G6	+	-
9B5	+	+
9B7	+	+
9B9	+	-
9B10	+	-
9D11	+	+
9E12	+	+
9F5	+	+
9F7	-	-
9G1	+	-
9H11	+	-
10A2	+	-
10A3	+/-	-
10A4	+	-
10A8	+	-
10A9	+	-
10B10	+	-
10D3	+	-
10D11	+	-
10E4	+	+
10F1	+	-
10F12	+	-
10G1	+	-
10G2	-	-
10H11	+	+
1A7	+	-
1D6	+	-
1D9	+	-

[0219]

克隆名称	与 $\alpha_v\beta_6$ 结合	与 HPLC 纯化的 β_6 亚基结合
1F6	+	-
2B1	+	-
2D9	+	+
2G2	+	+
3D9	+	+
3E5	+	-
4C12	+	-
4E6	+	+
4G5	+	-
5A3	+	-
5B3	+	-
5B8	+	+
5B9	+	-
5F7	+	-
6C10	+	+
6D8	+	-
6F4	+	-
6G9	+	-
6H8	+	+
6H9	+	-
7A5	+	+
7A11	+	-
7E6	+	+
7G9	-	+
7H3	+	-
9A2	-	-
9A3	+	+
9A4	-	-
9A9	+	-
9D2	-	-
9D3	-	-
9E4	-	-
9F1	+	-
9F12	-	-
9G11	-	-
10B5	+	-
10B7	+	-
10B9	+/-	-
10C5	+/-	-
10C7	+/-	-
10D6	+/-	-
10E12	+/-	-
10F7	-	-

[0220] 如上所示,一些抗体可与纯化的 β_6 亚基结合。它们与变性 $\alpha_v\beta_6$ 结合的可能性较高,因而能够用于检测石蜡包埋的组织切片中的 $\alpha_v\beta_6$ 。有些抗体可结合可溶性 $\alpha_v\beta_6$,

而不结合 β_6 亚基。这两类抗体都用来染色变性的石蜡包埋的 β_6 转染的 SW480 细胞和未转染的亲本细胞,数据在表 6 中显示。

[0221] 为了染色石蜡包埋的组织或细胞,标本载玻片首先通过在下列溶液中温育去除石蜡 (de-paraffinized): (1) 二甲苯, 5 分钟, 两次; (2) 100% 乙醇, 2 分钟, 两次; (3) 95% 乙醇, 2 分钟, 两次; (4) 50% 乙醇, 2 分钟, 一次; 和 (5) 蒸馏水, 2 分钟, 一次。载玻片然后在含有 200ml 甲醇和 3ml 30% H_2O_2 的溶液中温育 15 分钟, 以封闭内源过氧化物酶。载玻片用 PBS 漂洗两次, 每次 2 分钟。然后用胃蛋白酶 (Zymed 00-3009) 暴露载玻片上的石蜡切片, 37°C 5 分钟。载玻片再用 PBS 漂洗两次, 每次 2 分钟。然后, 先用抗生物素蛋白然后用生物素 (Vector SP-2001; Vector Laboratories, Burlingame, CA) 封闭载玻片, 每次在室温下 10 分钟, 在每次温育之间如上所述洗涤。从载玻片上除去封闭溶液, 之后向载玻片上添加用 PBS/0.1% BSA 稀释的第一抗体 (杂交瘤培养上清液), 在 4°C 下温育过夜。

[0222] 次日, 载玻片如上所述用 PBS 漂洗。同时, 如下制备抗生物素蛋白-生物素复合物-辣根过氧化物酶溶液 (ABC 试剂): 1ml PBS 与来自 Vector Kit PK-6102 的 20 μ l 溶液 A (1 : 50) 和 20 μ l 溶液 B (1 : 50) 混合; 混合物在使用前在室温下温育 30 分钟。在此期间, 载玻片与含有 15 μ l/ml 正常血清的来自 Vector Kit 的抗小鼠生物素化抗体 (1 : 200) 在室温下温育 30 分钟。然后用 PBS 漂洗载玻片两次, 每次 2 分钟。然后向载玻片上添加上述 ABC 试剂, 在室温下温育 30 分钟。再次如上所述漂洗载玻片。向载玻片上添加底物 (Vector SK-4100)——100 μ l DAB (3,3'-二氨基联苯胺), 在室温下温育 5 分钟。DAB 如下制备: 向 5ml H_2O 中加入 2 滴缓冲液贮存溶液, 充分混合; 然后加入 4 滴 DAB 贮存溶液, 充分混合; 然后加入 2 滴 H_2O_2 溶液, 充分混合。用流水漂洗载玻片 2 分钟。其次, 如下增强所有载玻片的 DAB 信号: 用 0.05M 碳酸氢钠, pH 9.6 漂洗石蜡切片 10 分钟; 印迹过量的缓冲液; 加入 DAB 增强溶液 15 秒; 然后用水快速漂洗 1 分钟终止反应。载玻片然后在 Mayer's 苏木精 (一种核复染剂) 中染色 1 分钟。用流水漂洗载玻片 1 分钟, 然后在 PBS 中浸没 1 分钟, 使苏木精变成蓝色。再用流水漂洗载玻片 1 分钟, 脱水, 如下澄清: 浸没于 (1) 95% 乙醇中 1 分钟, 两次; (2) 100% 乙醇中 1 分钟, 两次; 和 (3) 二甲苯中 2 分钟, 两次。然后使用 permount 向载玻片上加上盖玻片。

[0223] 结果提示, 融合 6 抗体 1A1、2C4、3B2、3B11、5D6、5G9、5H3、6D12、7C7、9B5、9B7、9D11、9F5、10E4、10H11、6H8、7A5、7G9、9A3、2A1、2E5、4E4、4H4、8B4、2G2 和 4E6, 它们都能够结合纯化的 β_6 亚基 (表 5), 确实能够强烈染色石蜡包埋的 β_6 转染的 SW480 细胞, 而不染色未转染的亲本细胞 (表 6)。

[0224] 表 6 可与石蜡包埋的 SW480 细胞结合的抗体

[0225]

ID#	克隆名称	与 SW480/ β_6 +结合	与 SW480 结合
1	1A1	+++	-
2	1A8	+	+
3	1A11	++	-
4	1E1	+	-
5	1E6	++	+
7	2A1	+++	-
10	2B10	-	-
11	2C4	+++	-
12	2C7	-	-
13	2E5	+++	-
17	3B2	+++	-
18	3B11	++	-
25	3G9	-	-
30	4B4	+	+
33	4E4	+++	-
35	4G4	-	-
36	4H4	+++	-
39	5B6	+	-
40	5D6	+++	-
42	5G9	+++	-
43	5G10	-	-
44	5H3	+++	-
46	6B5	-	-
48	6D12	+++	-
52	7C7	++	-
54	7F8	-	-
55	8B4	+++	-
56	8G6	-	-
57	9B5	++	-
58	9B7	++	-
61	9D11	++	-
62	9E12	+	-
63	9F5	++	-
68	10A3	-	-
75	10E4	+++	-
80	10H11	++	-
85	2B1	+	+
87	2G2	+++	-
91	4E6	+++	-
95	5B8	-	-

[0226]

ID#	克隆名称	与 SW480/ β_6 +结合	与 SW480 结合
98	6C10	+	-
102	6H8	++	-
104	7A5	+++	-
107	7G9	+++	-
110	9A3	+++	-

[0227] 实施例 11 :癌症的诊断

[0228] $\alpha_v\beta_6$ 在健康成人组织中通常以可以忽略的水平到低水平表达。然而, $\alpha_v\beta_6$ 的表达在损伤、纤维化和癌症中上调(参见,例如,Thomas 等人. J. Invest. Dermatology 117 : 67-73(2001) ;Brunton 等人, Neoplasia3 :215-226(2001) ;Agrez 等人, Int. J. Cancer 81 : 90-97(1999) ;Breuss, J. Cell Science 108 :2241-2251(1995))。因此,为了诊断纤维化、癌症和 $\alpha_v\beta_6$ 上调的其它任何疾病,在标准免疫组化技术中能够使用与石蜡包埋的组织上表达的 $\alpha_v\beta_6$ 特异性结合的抗体检测 $\alpha_v\beta_6$ 的表达。

[0229] 如上所述,本发明的某些抗体结合 HPLC 纯化的 β_6 整联蛋白和石蜡包埋的并固定的 β_6 转染的细胞。在免疫染色中也证实这些抗体可与典型的鳞状癌和乳癌组织结合。参见,例如图 8,其中单克隆抗体 6. 2A1 用来显示石蜡包埋的乳癌和鳞状癌的相对染色。因此,这些新抗体可以用作诊断工具。

[0230] 实施例 12 :抗 $\alpha_v\beta_6$ 阻断单克隆抗体在 Alport 小鼠中的作用

[0231] 胶原蛋白 4A3(COL4A3) 敲除 (Alport) 小鼠已经被建立为一种肾纤维化的体内模型,用来检测药理制剂的治疗效果(同上)。我们在 Alport 小鼠中检验了 mAb 6. 8G6(依赖阳离子的) 和 6. 3G9(不依赖阳离子的), 来确定它们是否抑制在 7 周龄 Alport 小鼠中常见的纤维化。如上所示,发现在生物测定中这两种抗体能够抑制 $\alpha_v\beta_6$ 与 LAP 的结合,并且抑制 TGF- β 的激活。抗体 1E6 作为阴性对照。

[0232] 3 周龄 Alport 小鼠一周 3 次腹腔内注射下列抗体之一 : (1) 6. 8G6, 4mg/kg(7 只小鼠) ; (2) 6. 3G9, 4mg/kg(4 只小鼠) ; 和 (3) 1E6, 1mg/kg(6 只小鼠)。连续注射 4 周。然后杀死小鼠,取肾脏。

[0233] 如上所述制备石蜡包埋的肾脏切片,然后染色,检测平滑肌肌动蛋白——肾纤维化中成肌细胞和基质沉积的一种标记物。我们发现,与 1E6 处理的小鼠相比,在 mAb 6. 8G6 或 6. 3G9 处理的 Alport 小鼠的肾脏间质和肾小球区中,平滑肌肌动蛋白染色显著减少。

[0234] 图 11A 和 11B 显示 Alport 肾脏的肾小球和间质区中平滑肌肌动蛋白染色的点图。与阴性对照 1E6 处理的小鼠相比,6. 8G6 和 6. 3G9 处理的 Alport 小鼠的肾脏中平滑肌肌动蛋白染色显著减少。

[0235] 实施例 13 :抗 $\alpha_v\beta_6$ mAb 在预防单侧输尿管阻塞诱导的肾硬化症方面的有效性

[0236] 我们使用另外一种肾纤维化进展小鼠模型来检验 6. 8G6 和 6. 3G9 的抗纤维化效能。在这个小鼠模型中,动物的一侧输尿管被结扎,导致单侧输尿管阻塞(UUO)。在小鼠中,UUO 导致进行性肾硬化症而不导致短期肾衰竭,因为未阻塞的肾脏能够维持相对正常的肾功能。阻塞的肾脏经历快速肾小球纤维化,而未阻塞的肾脏则经历适应性肥大。

[0237] 该研究通过形态测量定量抗 $\alpha_v\beta_6$ 处理对 UUO 诱导的肾纤维化的影响。使用体

重 25.5 ± 0.2 g 的不含病毒抗原的 8-12 周龄雄性 C57BL 小鼠 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)。在开始研究前使小鼠适应 7 天。在适应和实验期间小鼠可随意获得照射的标准鼠食和无菌水。定期称量体重,作为动物健康监测的一部分。结果显示,年龄匹配的未操作的小鼠在两周的研究期内体重增加约 10%。UUO 小鼠到第二天体重减少约 9%,但是到第 14 天减少的体重逐渐恢复。这种体重改变模式与治疗处理无关。

[0238] 为了诱发肾纤维化,在氯胺酮:赛拉嗪 (100 : 10mg/kg 皮下) 麻醉下,通过中线左侧剖腹术无菌分离左输尿管。将两条拉紧的阻塞 6-0 结扎丝线置于输尿管上位于肾脏较低极 (lower pole) 的水平,在结扎线之间切开输尿管。腹壁用 4-0 Vicryl 缝线闭合,皮肤用 4-0 尼龙闭合。使动物在热垫上恢复,在第 0 天和第 1 天皮下给予 0.05mg/kg 丁丙诺啡,每日两次。该程序来自 Ma 等人, *Kidney Int.* 53(4) :937-944(1998)。

[0239] 然后将小鼠分为下列研究组:

[0240]

组别	处理	剂量 (mg/kg, 腹膜内)	n*
1	6.8G6 (依赖阳离子的抗 $\alpha_v\beta_6$ mAb)	4	9
2	6.3G9 (不依赖阳离子的抗 $\alpha_v\beta_6$ mAb)	4	8
3	1E6 (阴性对照 mAb)	4	10
4	PBS 载体对照	(100 μ l)	8
5	未操作的未处理的对照	--	8

[0241] *动物数

[0242] 除了第 5 组之外所有动物都从手术前一天开始每周两次施用。

[0243] 然后在结扎后的第 10 天用二氧化碳麻醉动物,并解剖。在 UUO 小鼠中,肾盂和输尿管显著肿胀,液体充满于阻塞的结扎处之上。在处理组之间,肿胀程度和其余肾组织质量范围不同。第 2 组显示约为阴性对照组的肿胀的一半。结扎的肾脏颜色灰白。对侧肾脏鲜红,增大约三分之一。

[0244] 然后,取出动物的两个肾脏 (左侧结扎,右侧未结扎),通过肾盂中心对半横切。将每个肾脏的一半置于 10% 中性缓冲的福尔马林中进行固定组织染色。每个肾脏的另一半置于 15% 蔗糖中,随后置于 30% 蔗糖中,进行免疫组化染色。

[0245] 针对肌成纤维细胞 (平滑肌肌动蛋白)——纤维化的一种标记,免疫染色福尔马林固定的肾脏切片。用标准化的光照条件和数码相机曝光设置获取图像,根据背景校正,并根据距离标准校准。从每只动物获取涵盖整个左肾切片的相邻视野的图像进行定量。

[0246] 平滑肌肌动蛋白表示为测量的视野内总组织面积的百分数。包括除了肾乳突之外的切片的所有皮质和髓质组织。

[0247] 总之,用 6.3G9 和 6.8G6 处理的小鼠显示纤维化显著减少。

[0248] 实施例 14:抗 $\alpha_v\beta_6$ 阻断单克隆抗体对博来霉素诱发的小鼠肺纤维化的有效性

[0249] 博来霉素诱发的小鼠肺纤维化已经建立为一种体内肺纤维化模型,用来检验药理

制剂的治疗效果。在博来霉素处理 5-15 天后炎症通常明显。在 129 系小鼠中,肺纤维化程度逐渐增大,可到博来霉素处理后的 60 天。基质积累通常在第 15 天左右可检测到。在该实施例中,从第 0 天或第 15 天开始,以 4mg/kg/ 次的浓度对博来霉素诱发的肺纤维化小鼠腹膜内注射单克隆抗体 6. 3G9,每周 3 次。在第 0 天诱发肺纤维化,方法是施用气管内单剂量的博来霉素,其溶于 50 μ l 无菌盐水中,浓度为 0.03 单位 /kg。在第 30 天杀死动物,评价肺纤维化程度。抗体 1E6 作为阴性对照。

[0250] 收集每只动物的肺,如上文 Munger 等人所述,测定羟脯氨酸含量作为肺胶原蛋白沉积的指数。如图 15A 所示,在第 0 天开始用 6. 3G9 处理显著抑制博来霉素诱发的肺羟脯氨酸含量的增加。重要的是,6. 3G9 处理至少如在博来霉素施用后 15 天开始时一样有效,此时胶原蛋白沉积已经开始。

[0251] 我们也用延长的博来霉素诱发纤维化方案(持续 60 天)检查了 6. 3G9、依赖阳离子的 6. 8G6 和非阻断抗体 6. 4B4 抑制更高程度肺纤维化的作用。为此,我们在施用博来霉素后 15 天(第 15 天)开始抗体处理。然后在第 60 天取肺,检测羟脯氨酸含量。如图 15C 所示,用 6. 8G6 处理显著抑制博来霉素诱发的纤维化(与博来霉素和盐水处理的动物相比,羟脯氨酸含量减少 70% 以上)。用 6. 3G9 处理也显示保护的 trend,但是这些结果没有统计学显著性(图 15C)。

[0252] 总之,在博来霉素处理的小鼠中,依赖阳离子的和不依赖阳离子的抗 $\alpha_v\beta_6$ 阻断单克隆抗体都减少肺纤维化。而且,甚至在直到纤维化开始发生后才开始抗体处理,这种干预仍然有效。

[0253] 实施例 15 :人银屑病损伤中 $\alpha_v\beta_6$ 的上调

[0254] 为了确定 $\alpha_v\beta_6$ 是否与银屑病有关,检查了 5 名银屑病患者和 4 名正常个体的损伤和非损伤皮肤活检上的 $\alpha_v\beta_6$ 表达。利用 mAb 6. 2A1 免疫染色,我们发现,与银屑病患者在非损伤皮肤和正常对照相比,银屑病损伤中 $\alpha_v\beta_6$ 表达显著提高。因此,银屑病损伤中 $\alpha_v\beta_6$ 的上调提示使用抗 $\alpha_v\beta_6$ 抗体的诊断和治疗意义。

[0255] 实施例 16 :在患有胆道疾病的小鼠和人肝脏中 $\alpha_v\beta_6$ 的上调

[0256] 如前所述, $\alpha_v\beta_6$ 的表达与组织损伤有关。在该研究中,研究了被胆道疾病损伤的小鼠和人肝脏中 $\alpha_v\beta_6$ 的表达。

[0257] 通过胆道结扎诱发小鼠的肝损伤。参见,例如,George 等人,PNAS96 : 12719-24(1999) ;George 等人,Am J Pathol 156 :115-24(2000)。使用 mAb 6. 2G2,我们发现 $\alpha_v\beta_6$ 的表达在胆道结扎后的第 9、14、16 天显著升高。

[0258] 类似地,通过使用 mAb 6. 2G2 的免疫组化检测,患有胆道疾病的患者的人肝脏切片显示 $\alpha_v\beta_6$ 表达上调。例如,在来自 1 名 44 岁的急性胆汁淤积男性患者、1 名 59 岁的移植后急性胆道阻塞男性患者、1 名 22 岁的胆道闭锁男性患者和 1 名 24 岁的慢性胆道阻塞男性患者的肝脏标本中观察到 $\alpha_v\beta_6$ 表达提高。

[0259] 总之,这些新抗 $\alpha_v\beta_6$ 抗体是对于肝疾病有用的诊断和治疗工具。

[0260] 实施例 17 :多种人类癌症中 $\alpha_v\beta_6$ 的上调

[0261] 整联蛋白 $\alpha_v\beta_6$ 在健康成人组织中通常以可以忽略的水平到低水平表达。使用抗体 6. 2A1 和此处概述的方法,评价了多种人肿瘤组织的 $\alpha_v\beta_6$ 表达。结果显示在几种人上皮癌中 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白的表达显著上调。特别是,免疫组织学显示, $\alpha_v\beta_6$ 在多种上皮癌

的肿瘤岛边缘上特别显著地表达。为了进一步研究上皮癌细胞中 $\alpha_v\beta_6$ 的表达, Detroit 562 细胞 (咽癌) 和 SCC-14 细胞 (舌鳞状细胞癌) 以及 SW480 β_6 细胞 (同上) 用 6.3G9 和 6.4B4 染色, 通过流式细胞术分析。

[0262] 图 12 的右侧显示不同肿瘤细胞系上的 $\alpha_v\beta_6$ 表达, 用荧光激活细胞分选 (FACS) 中 6.3G9 的结合表示。实心峰代表 6.3G9 的结合, 而空心峰代表第二单克隆抗体单独的背景结合。图 12 左侧的线图显示浓度逐渐升高的 6.3G9 或 6.4B4 对肿瘤细胞系与 LAP 配体结合的抑制。与 6.3G9 相比, 6.4B4 是 $\alpha_v\beta_6$ 与 LAP 结合的一种效能显著较低的抑制剂 (对于 Detroit 562, > 10 倍 IC_{50} ; 对于 SW480B6, > 30 倍 IC_{50} ; 对于 SCC-14, > 100 倍 IC_{50})。这与以前的体外结果一致, 表明 6.3G9 是一种强阻断单克隆抗体, 6.4B4 是一种弱阻断单克隆抗体。该数据也与 Detroit 异种移植模型中 6.4B4 的可以忽略的抑制活性一致 (图 14B)。图 13 进一步显示多种抗 $\alpha_v\beta_6$ 单克隆抗体对肿瘤细胞系与 LAP 结合的相对抑制。6.3G9 和 6.8G6 显示相当的抑制活性 (与以前的所有数据一致), 而 6.4B4 是 $\alpha_v\beta_6$ 与 LAP 结合的一种效能显著较低的抑制剂。

[0263] 实施例 18: 抗 $\alpha_v\beta_6$ 阻断单克隆抗体在人肿瘤异种移植模型中的作用

[0264] 移植了人肿瘤异种移植物的免疫缺陷动物 (例如裸鼠和 SCID 小鼠) 已经建立为一种有用的体内模型, 用来检验抗癌剂的治疗效果 (参见, 例如, van Weerden 等人, Prostate 43(4):263-71(2000); Bankert 等人, Front Biosci 7:c44-62(2002))。因此, 能够在异种移植模型中体内检验本发明的阻断抗 $\alpha_v\beta_6$ 单克隆抗体抑制肿瘤生长的能力。在该实验中, 我们在移植了人咽癌 (Detroit 562 细胞系) 异种移植物的无胸腺雌性裸鼠中检验了一些新 $\alpha_v\beta_6$ 抗体抑制肿瘤生长的能力。

[0265] 为此, Detroit 562 细胞 (ATCC) 在基本必需培养基 (Eagle) 中体外传代, 该培养基中含有 2mM L-谷氨酰胺和 Earle's BSS, 调节为含有 1.5g/L 碳酸氯钠、0.1mM 非必需氨基酸和 1.0mM 丙酮酸钠和 10% 胎牛血清, 不含抗生素。约 5×10^6 细胞 / 0.2ml 培养基 (不含血清) 皮下植入裸鼠的右肋。3-4 天后开始测量肿瘤大小, 持续到肿瘤达到约 5mm (长度) $\times$ 5mm (宽度)。将小鼠随机化, 在第 1 天腹膜内注射检测抗体或对照溶液, 随后每周注射 3 次, 共 33 天。检测抗体和对照溶液是: (1) 6.3G9, 1mg/kg, 10 只小鼠; (2) 6.3G9, 4mg/kg, 10 只小鼠; (3) 6.3G9, 10mg/kg, 10 只小鼠; (4) 6.4B4, 1mg/kg, 10 只小鼠; (5) 6.4B4, 4mg/kg, 10 只小鼠; (6) 6.4B4, 10mg/kg, 10 只小鼠; 和 (7) 载体对照 (PBS), 0.2ml / 每只小鼠, 30 只小鼠。另外, 对 10 只小鼠皮下注射 2mg/kg 顺铂作为化疗对照。顺铂注射在第 1 天进行, 然后每 2 天注射一次, 总共 6 次治疗。在 33 天结束时, 测量动物体重和肿瘤大小, 通过免疫组织学评价 $\alpha_v\beta_6$ 的表达, 测定血清抗 $\alpha_v\beta_6$ 水平。

[0266] 免疫组织学染色显示, 植入的肿瘤细胞在体内强烈表达 $\alpha_v\beta_6$ 。肿瘤重量数据进一步证明, 阻断单克隆抗体 6.3G9 在检测的所有三个浓度都有效抑制肿瘤生长 (图 14A)。相反, 弱阻断的单克隆抗体 6.4B4 不抑制肿瘤生长 (图 14B)。

[0267] 总之, 在处理的小鼠中, 阻断抗体抑制肿瘤生长 40-50%。相反, 弱阻断的抗 $\alpha_v\beta_6$ 抗体不抑制肿瘤生长。

[0268] 实施例 19: $\alpha_v\beta_6$ 抗体的内化

[0269] 被细胞内化的抗体对于某些临床适应证 (如癌症) 有优点, 因为这些抗体能够与毒素、放射性化合物或其它抗癌剂偶联, 从而选择性靶向并抑制癌细胞的生长。在

SW480 β_6 (同上) 和 SCC-14 细胞中研究了抗 $\alpha_v\beta_6$ 抗体被内化的能力。

[0270] 将细胞 1 : 5 分开, 接种于 4 室载玻片上, 在 37°C 和 5% CO_2 下温育过夜。次日, 稀释单克隆抗体 6.8G6、6.1A8、6.3G9、7.1C5、6.4B4、10D5 和 8B3 至终浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 。将这些单克隆抗体或单独的培养基加到适当的孔中。内化的时间从 0 小时到 48 小时。包括的时点是 0、5、10、30 分钟, 和 1、4、24、48 小时。加入第二抗体 (抗鼠 -Alexa 594) 作为阴性对照。通过除去抗体并用缓冲液洗涤细胞层在每个时点终止内化。加入麦胚凝集素 -Alexa-488, 18°C 20 分钟, 用绿色荧光染色细胞的外缘。洗涤细胞后, 加入 Cytofix/Cytoperm 溶液, 18°C 20 分钟, 固定并透化细胞。再次洗涤细胞, 加入第二抗体抗小鼠 -Alexa 594 (红色荧光), 18°C 20 分钟, 标记结合的或内化的鼠 $\alpha_v\beta_6$ 抗体。然后洗涤细胞, 加入 2% 低聚甲醛固定, 用共聚焦显微镜检查。然后用 Leitz Plan-Apochromatic 63x (1.32 数值孔径, 空气曝浸 (oil immersion)) 物镜 (Leica) 以 2 倍数码变焦拍摄图像。每个画面代表一个光学切面, 它来自在所有条件下观察内化的细胞的中截面。在核中没有观察到染色。

[0271] 对于依赖阳离子的单克隆抗体 (含有 RGD 的模拟配体), 如 6.8G6 和 6.1A8, 观察到内化。对于不依赖阳离子的单克隆抗体, 如 6.3G9、7.1C5 和 6.4B4, 未观察到内化。

保藏日期	保藏编号	分类命名
2001 年 08 月 16 日	PTA-3645	Mouse hybridoma:violette mouse BI#3 clone #56 (鼠杂交瘤:violette 鼠 BI#3 克隆 #56)
2001 年 08 月 16 日	PTA-3646	Mouse hybridoma:violette mouse BI#3 clone #85 (鼠杂交瘤:violette 鼠 BI#3 克隆#85)
2001 年 08 月 16 日	PTA-3647	Mouse hybridoma:violette mouse BI#3 clone #2 (鼠杂交瘤:violette 鼠 BI#3 克隆#2)
2001 年 08 月 16 日	PTA-3648	Mouse hybridoma:violette mouse BI#3 clone #10 (鼠杂交瘤:violette 鼠 BI#3 克隆#10)
2001 年 08 月 16 日	PTA-3649	Mouse hybridoma:violette mouse BI#3 clone #25 (鼠杂交瘤:violette 鼠 BI#3 克隆#25)
2001 年 12 月 05 日	PTA-3896	Mouse hybridoma:6.2A1-1(#7) (鼠杂交瘤:6.2A1-1(#7))
2001 年 12 月 05 日	PTA-3897	Mouse hybridoma:6.2E5-1(#13) (鼠杂交瘤:6.2E5-1(#13))
2001 年 12 月 05 日	PTA-3898	Mouse hybridoma:7.1G10-2-1(#5) (鼠杂交瘤:7.1G10-2-1(#5))
2001 年 12 月 05 日	PTA-3899	Mouse hybridoma:7.7G5-1-1(#32) (鼠杂交瘤:7.7G5-1-1(#32))
2001 年 12 月 05 日	PTA-3900	Mouse hybridoma:7.1C5-1(#2) (鼠杂交瘤:7.1C5-1(#2))

[0001]

序列表

<110> BIOGEN, INC.
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

<120> 抗 $\alpha_v\beta_6$ 抗体

<130> A136PCT

<140> PCT/US03/08048
<141> 2003-03-13

<150> 60/364,991
<151> 2002-03-13

<150> 60/426,286
<151> 2002-11-13

<160> 64

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
Ser Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala Met His
1 5 10

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Ser Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met His
1 5 10

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Val Met Ser
1 5 10

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

[0002]

<400> 4

Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ser Ile Ser Ser Gly Gly Arg Met Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)

<223> Arg or Gln

<400> 7

Gly Gly Leu Arg Arg Gly Asp Arg Pro Ser Leu Xaa Tyr Ala Met Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gly Ala Ile Tyr Asp Gly Tyr Tyr Val Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 9

<211> 12

[0003]

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Gly Ser Ile Tyr Asp Gly Tyr Tyr Val Phe Pro Tyr
1 5 10

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met Tyr
1 5 10 15

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr
1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Ser Ala Asn Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr
1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

[0004]

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Gln His Asn Trp Glu Ile Pro Phe Thr
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 His Gln Trp Ser Thr Tyr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 19
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Gln Val Gln Phe Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Ser Ser Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Leu Ser His Ala Lys Thr Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Val Ile Asp Thr Tyr Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

[0005]

Glu Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Phe Arg Arg Gly Asp Arg Pro Ser Leu Arg Tyr Ala
100 105 110

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

<210> 20

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Ser Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Lys Leu Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Leu Arg Arg Gly Asp Arg Pro Ser Leu Arg Tyr Ala
100 105 110

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

<210> 21

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Ser Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Lys Leu Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

[0006]

Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Leu Arg Arg Gly Asp Arg Pro Ser Leu Gln Tyr Ala
 100 105 110
 Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 22
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met Asn Trp Val Met Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Lys Pro Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Met Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val His
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Tyr Gly Thr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 23
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

[0007]

```

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
    20                      25                      30
Val Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
    35                      40                      45
Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
    50                      55                      60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
    65                      70                      75                      80
Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
    85                      90                      95
Arg Gly Ala Ile Tyr Asp Gly Tyr Tyr Val Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
    100                     105                     110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
    115                     120

```

```

<210> 24
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 24
Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
  1                      5                      10                      15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
    20                      25                      30
Val Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
    35                      40                      45
Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Arg Met Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
    50                      55                      60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
    65                      70                      75                      80
Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
    85                      90                      95
Arg Gly Ser Ile Tyr Asp Gly Tyr Tyr Val Phe Pro Tyr Trp Gly Gln
    100                     105                     110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
    115                     120

```

```

<210> 25
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

[0008]

<400> 25

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

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

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

Gly Met Ile His Pro Ser Ile Ser Glu Thr Arg Leu Asn Pro Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Leu Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Gly Ser Asp Cys Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 26

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

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

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

Gly Met Ile His Pro Ser Ile Ser Glu Thr Arg Leu Asn Pro Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Leu Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

[0009]

```

<210> 27
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Val Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1             5             10             15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
      20             25             30
Trp Ile Asp Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
      35             40             45
Gly Glu Asn Leu Pro Gly Thr Arg Asn Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
      50             55             60
Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Pro Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Ile
      65             70             75             80
Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
      85             90             95
Arg Glu Ala Leu Gly Gly Asp Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
      100            105            110
Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
      115

```

```

<210> 28
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Val Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1             5             10             15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
      20             25             30
Trp Ile Asp Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
      35             40             45
Gly Glu Asn Leu Pro Gly Thr Arg Asn Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
      50             55             60
Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Pro Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Ile
      65             70             75             80
Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
      85             90             95
Arg Glu Ala Leu Gly Gly Asp Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
      100            105            110

```

[0010]

Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 29
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Val Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Trp Met Asp Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Asn Leu Pro Gly Thr Arg Asn Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
50 55 60
Gly Arg Ala Thr Phe Thr Ala Asp Pro Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Ile
65 70 75 80
Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Glu Ala Leu Gly Gly Asp Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 30
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

[0011]

Ala Arg His Val Leu Ser Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 31
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg His Val Leu Ser Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 32
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Arg Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

[0012]

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Val Leu Ser Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 33
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Arg Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Val Leu Ser Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 34
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34
 Gln Leu Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys
 20 25 30
 Ser Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 35 40 45

[0013]

Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Leu Asn Thr Lys Tyr Asn Glu
 50 55 60
 Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr
 65 70 75 80
 Val Tyr Met Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Glu Leu Asn Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 35
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Glu Lys Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Pro Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Glu Leu Asn Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 36
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

[0014]

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Leu Tyr Pro Gly Lys Ile Asn Thr Arg Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Ile Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Val Leu Asn Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 37
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ile Ser
 20 25 30
 Thr Tyr Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
 85 90 95
 Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 38
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

[0015]

Gln Arg Ala Ile Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Ser Tyr Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

Lys Phe Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Trp
85 90 95

Glu Ile Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 39

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

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

Asp Gln Ala Ser Met Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Lys His Ser
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

[0016]

<400> 40

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

Glu Arg Val Asn Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Ala Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala Thr Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 42

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

[0017]

<400> 42

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

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

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

<210> 43

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser His Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 44

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

[0018]

<400> 44

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

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Arg Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 45

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

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

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Asn Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Thr Tyr Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

[0019]

<400> 46

Val	Ile	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Lys	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Glu
1					5				10					15	

Gly

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Gly	Gly	Phe	Arg	Arg	Gly	Asp	Arg	Pro	Ser	Leu	Arg	Tyr	Ala	Met	Asp
1				5					10					15	

Ser

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ile	Ser	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Ile	His
1				5					10					15

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Gly	Tyr	Asp	Phe	Asn	Asn	Asp	Leu	Ile	Glu
1				5					10

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Gly	Tyr	Ala	Phe	Thr	Asn	Tyr	Leu	Ile	Glu
1				5					10

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

[0020]

<400> 51
Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 52
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Val Ile Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 53
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53
Ile Tyr Tyr Gly Pro His Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54
Ile Asp Tyr Ser Gly Pro Tyr Ala Val Asp Asp
1 5 10

<210> 55
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55
Lys Ala Ser Leu Asp Val Arg Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 56
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

[0021]

<400> 56

Lys Ala Ser Gln Ala Val Asn Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Ser Ala Ser Tyr Gln Tyr Thr
1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Gln Gln His Tyr Gly Ile Pro Trp Thr
1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Gln His His Tyr Gly Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 61

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

[0022]

```

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

Gly Val Ile Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
   50                      55                      60

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

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

Ala Ala Ile Asp Tyr Ser Gly Pro Tyr Ala Val Asp Asp Trp Gly Gln
   100                      105                      110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
   115                      120

```

<210> 62
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 62
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
  1                      5                      10                      15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Asn Asn Asp
                      20                      25                      30

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

Ala Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
   50                      55                      60

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

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

Ala Met Ile Tyr Tyr Gly Pro His Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
   100                      105                      110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
   115                      120

```

<210> 63
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 63
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Val Val Gly
  1                      5                      10                      15

```

[0023]

```

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Leu Asp Val Arg Thr Ala
      20                      25                      30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
      35                      40                      45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
      50                      55                      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Asn Ile Arg Ser Val Gln Ala
      65                      70                      75                      80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Gly Ile Pro Trp
      85                      90                      95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100                      105

```

```

<210> 64
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 64
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
  1                      5                      10                      15
Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ala Val Asn Thr Ala
      20                      25                      30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
      35                      40                      45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Gly Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
      50                      55                      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
      65                      70                      75                      80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Val Pro Trp
      85                      90                      95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100                      105

```

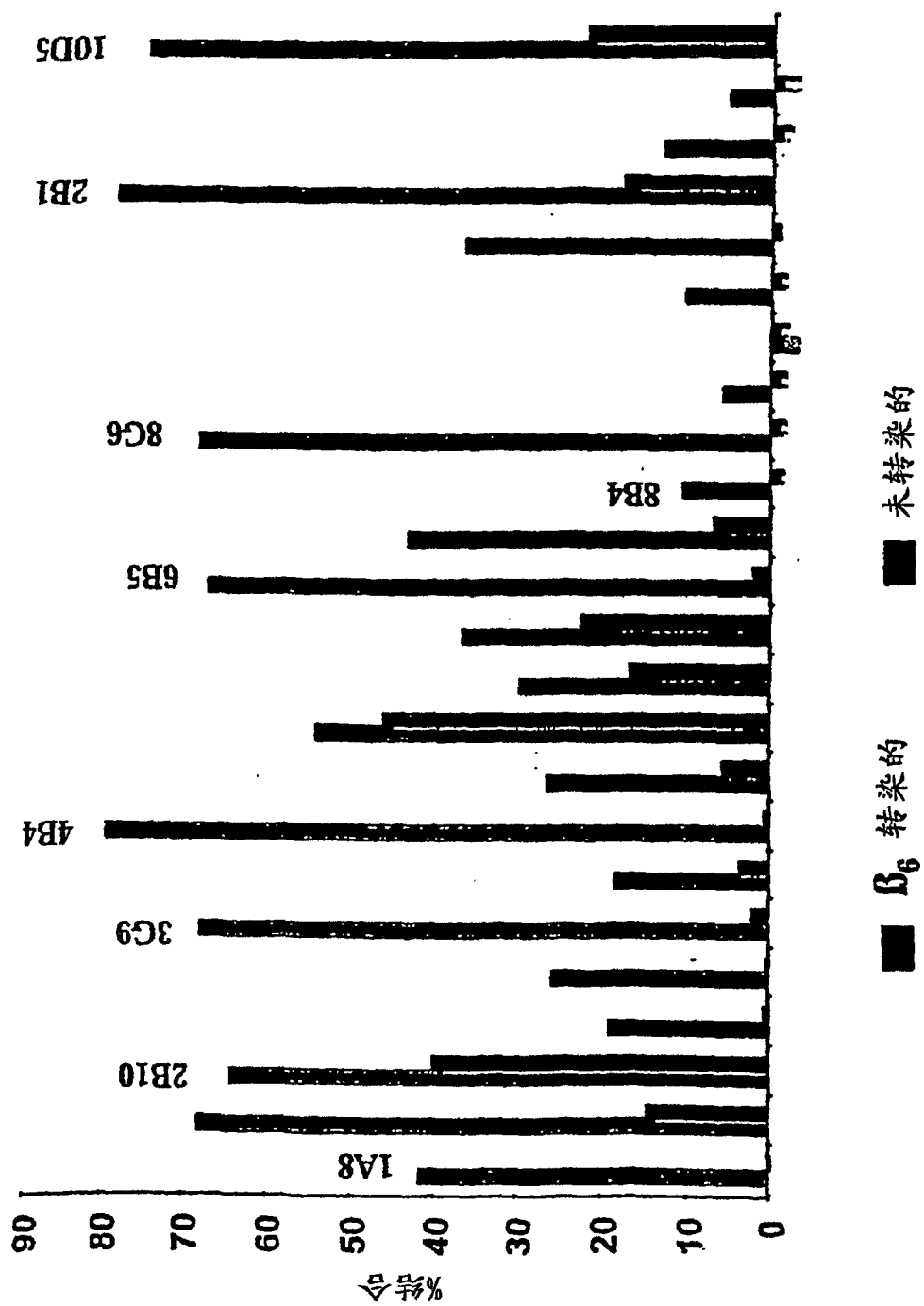


图 1A

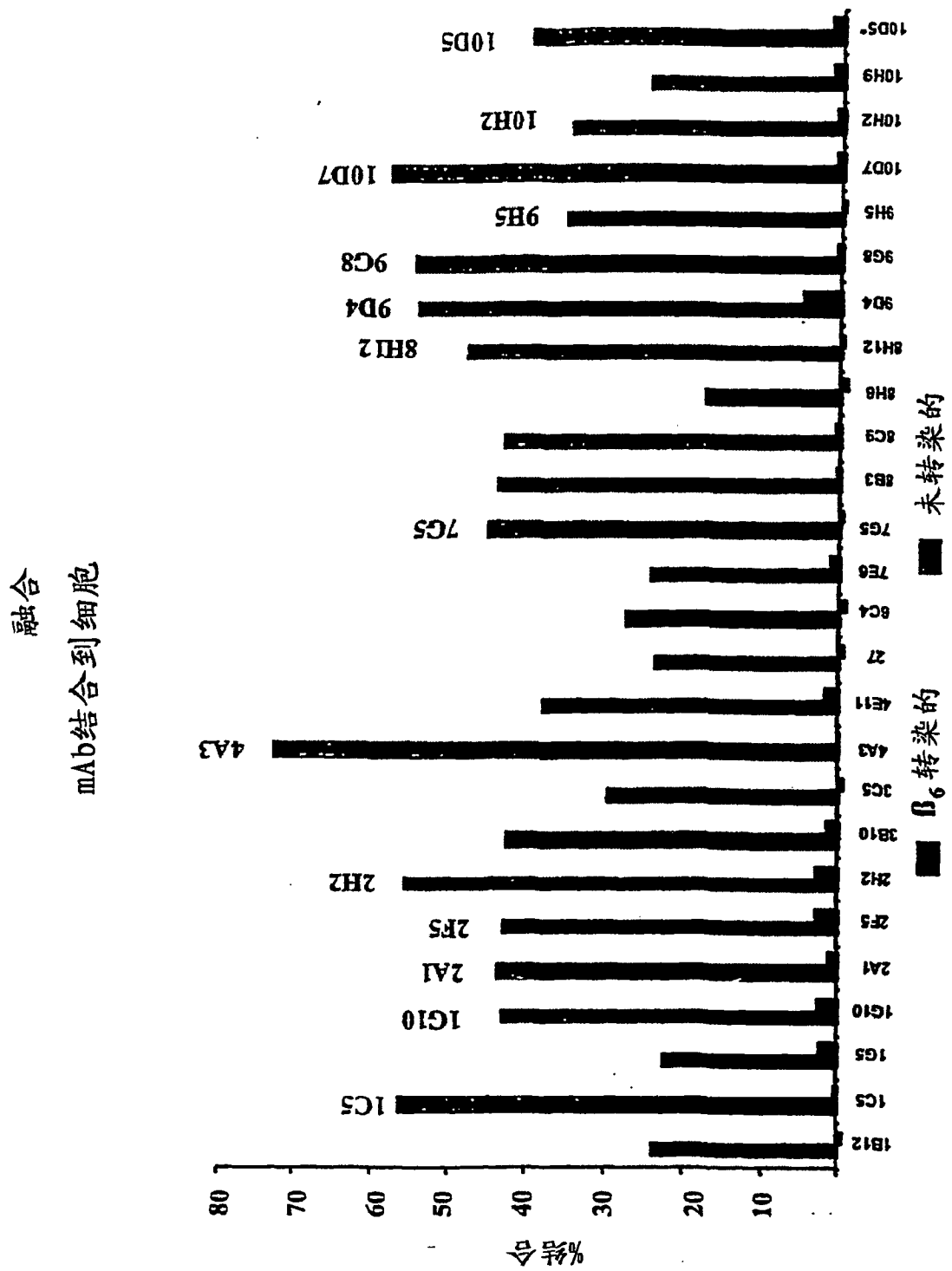


图 1B

对 $\alpha v \beta 6$ 的结合亲和力 (ELISA) - 融合#6mAbs

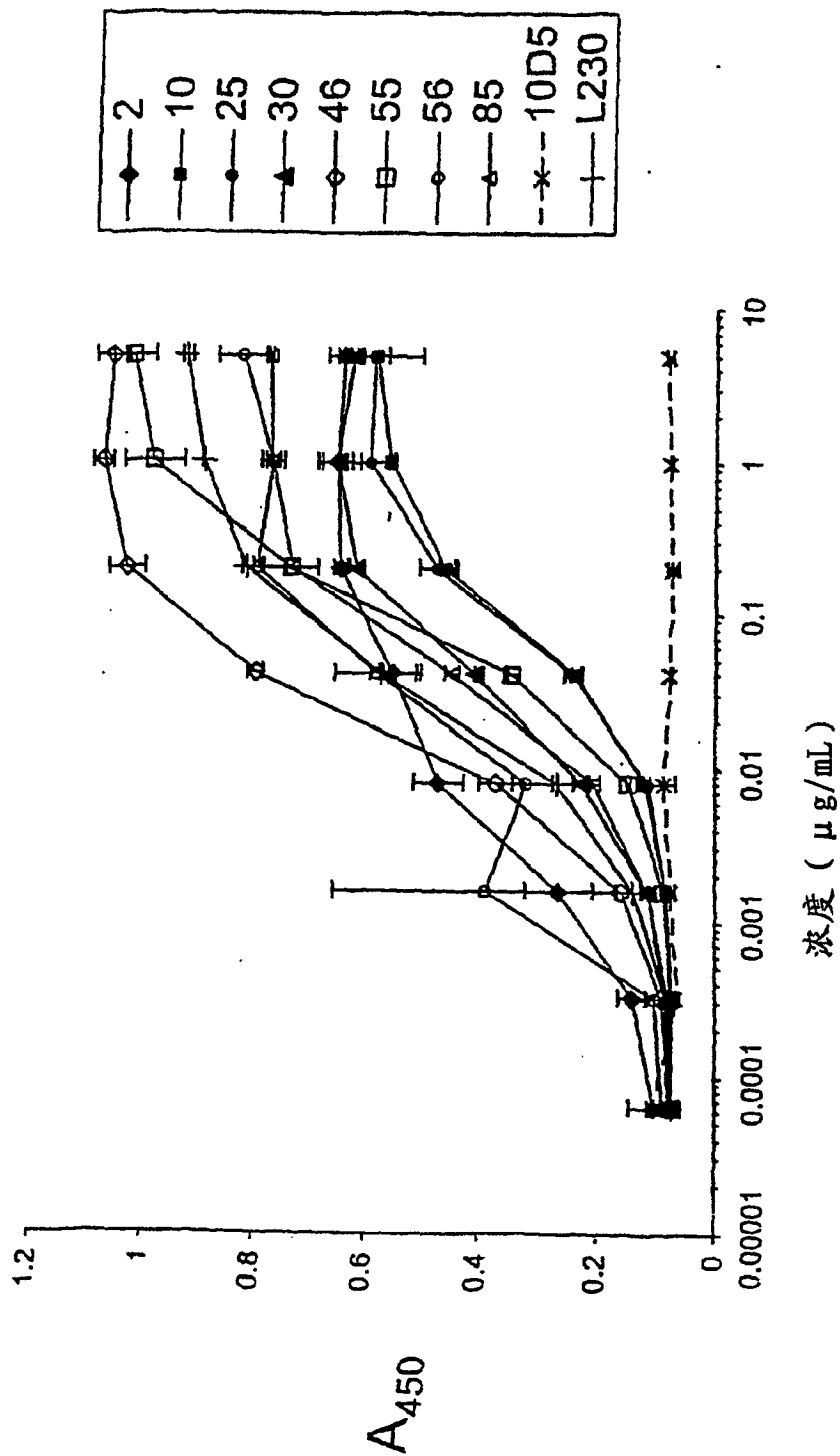


图 2A

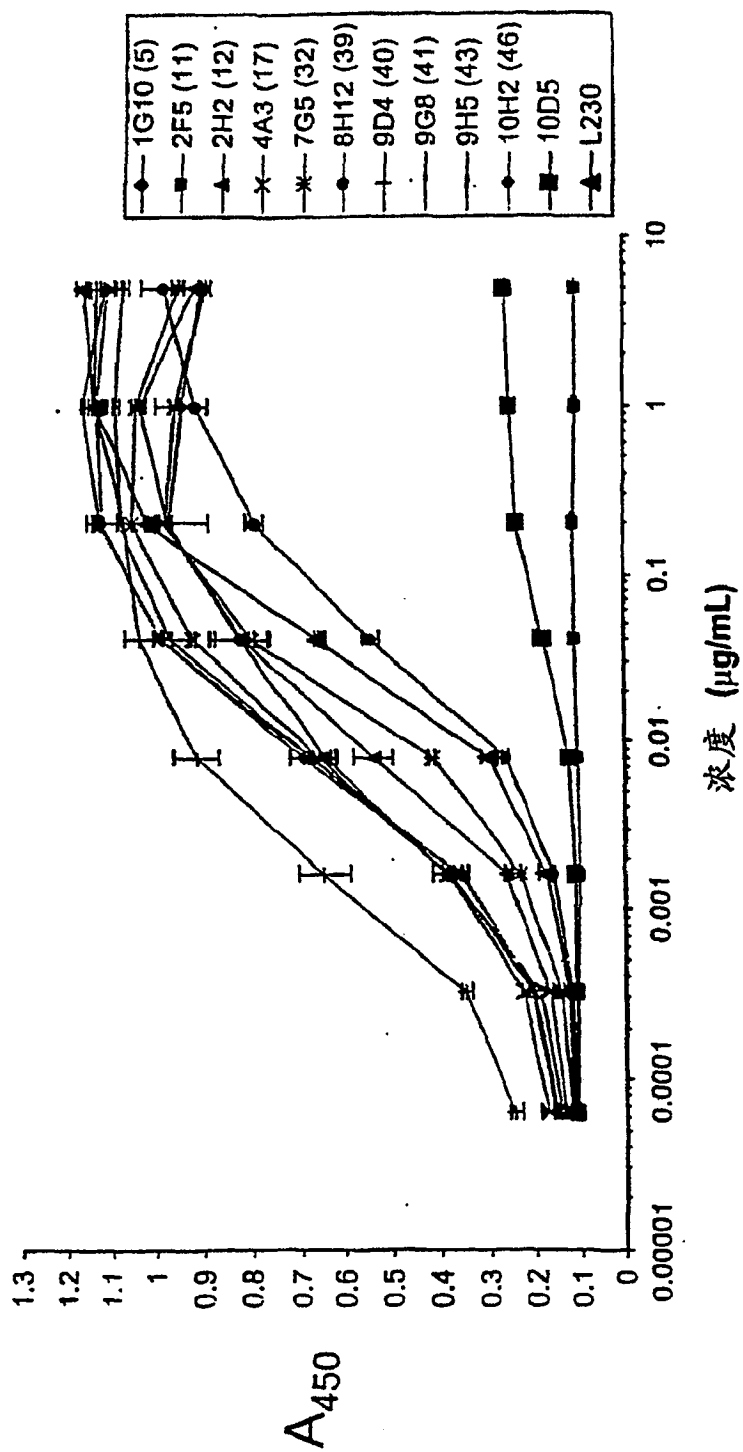
对 α v β 6 的结合亲和力 (ELISA) - 融合 #7mAbs

图 2B

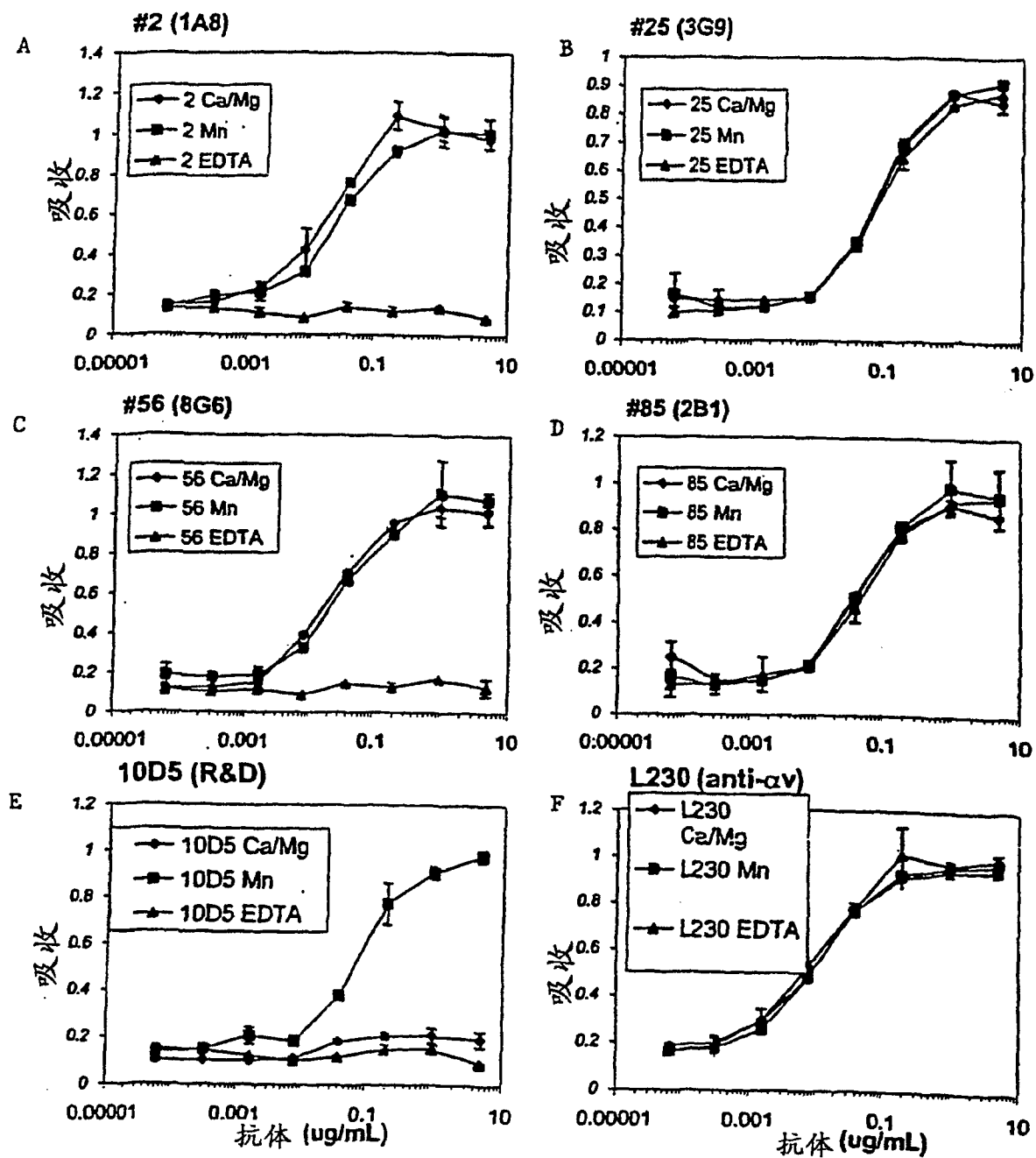
对可溶性 α v β 的阳离子依赖性结合

图 3A-F

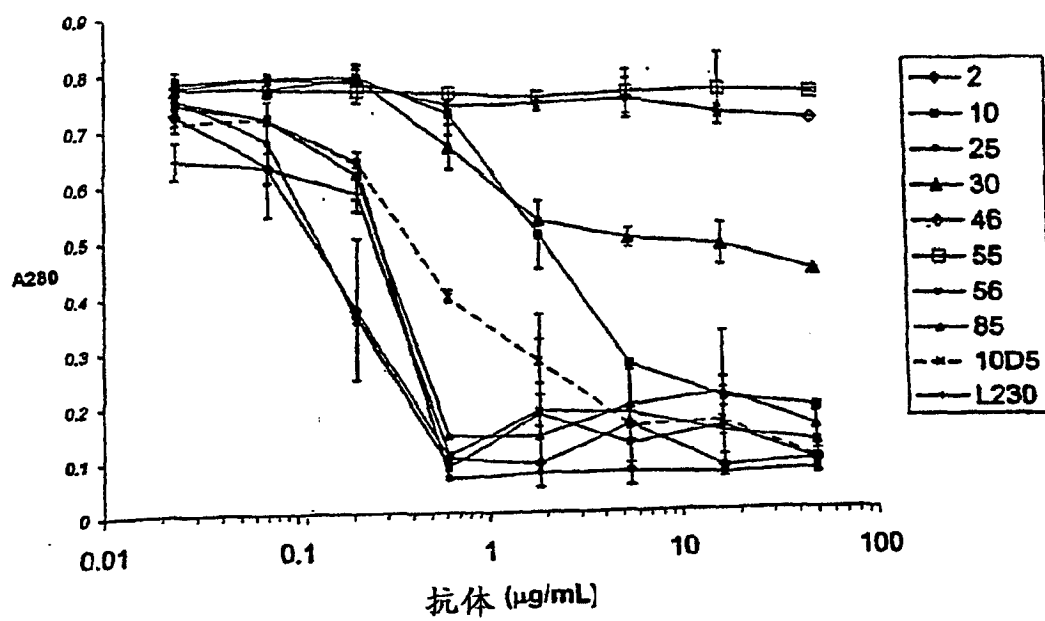


图 4A

生物素- α v β 6/LAP的抑制-融合#7mAbs

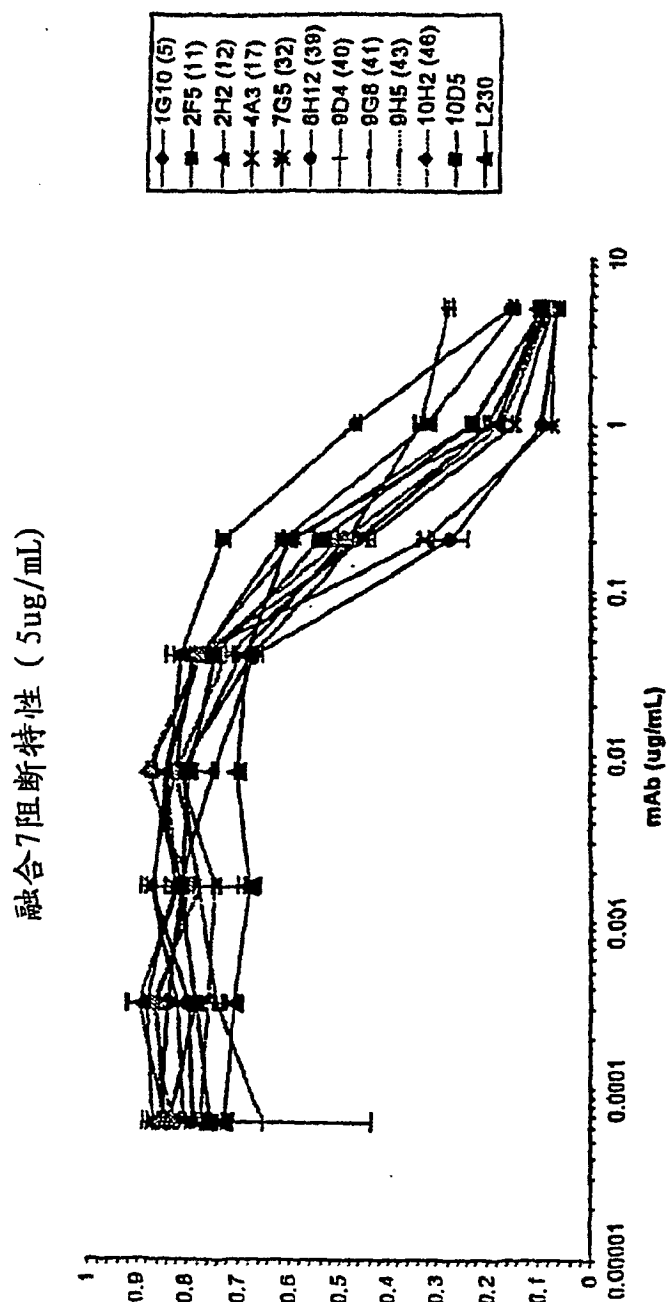
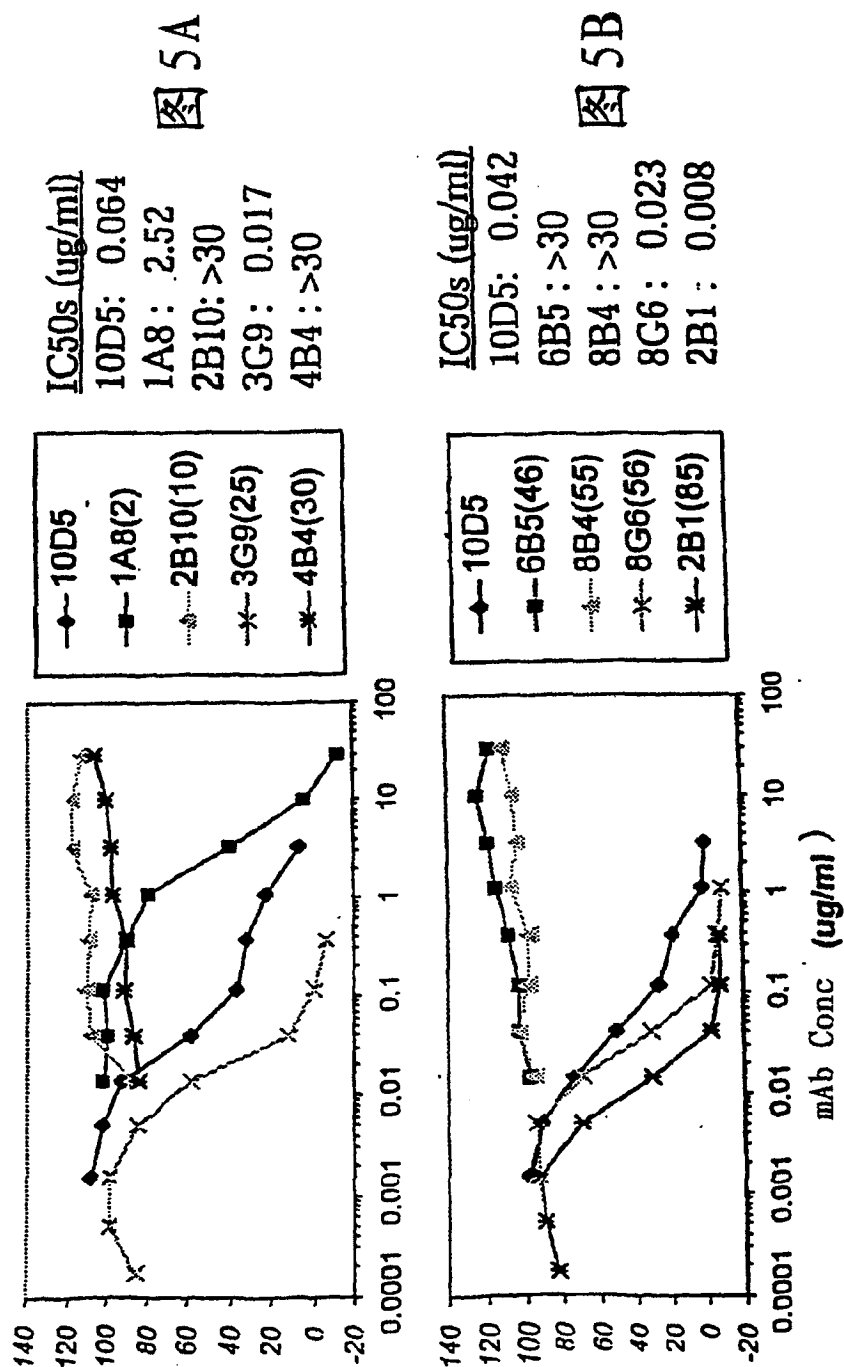
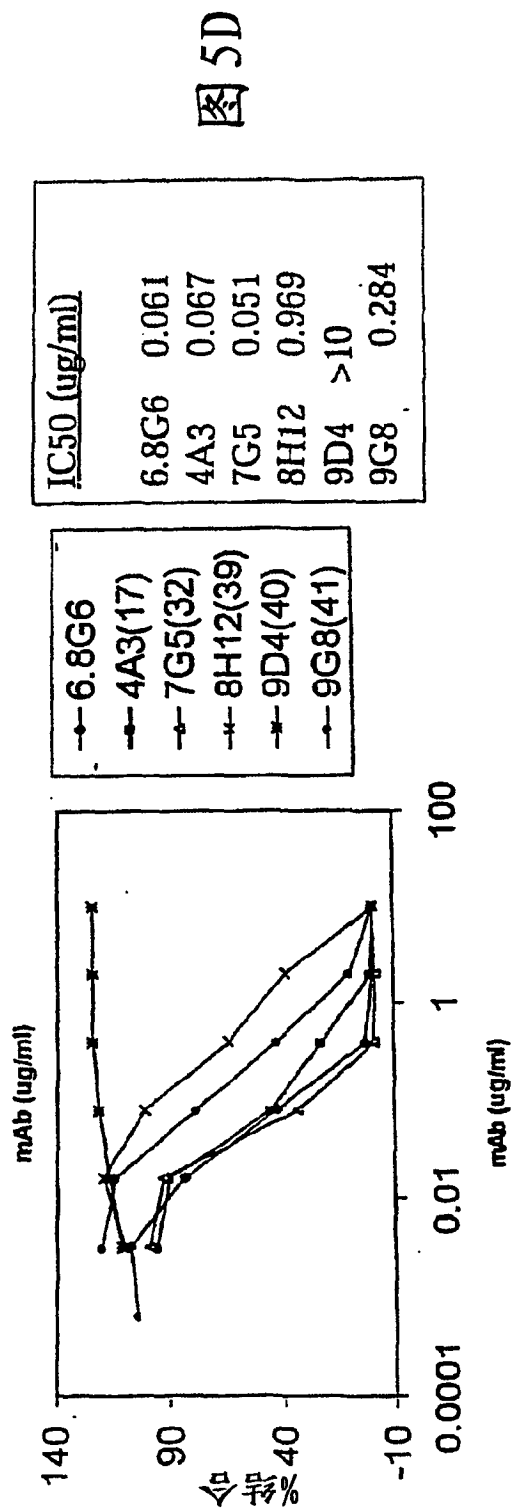
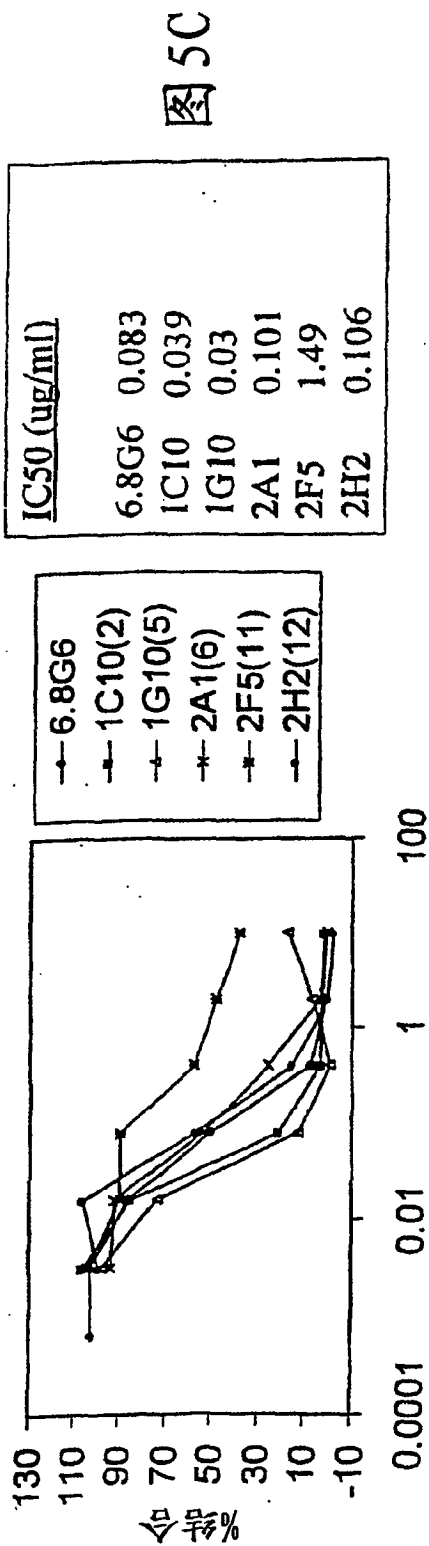


图 4B

β6(FDC-P1)对LAP 的吸附-融合 #6 mAbs



β6(FDC-P1)对LAP的吸附-融合#7mAbs



β6(FDC-P1)对LAP的吸附-融合 #7 mAbs

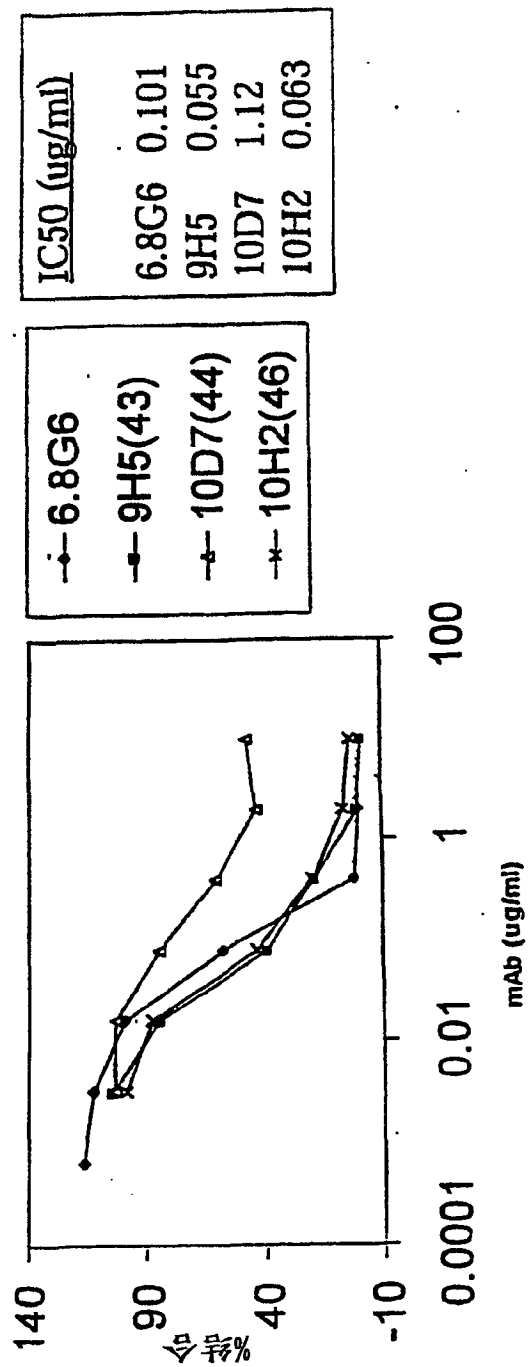


图 5E

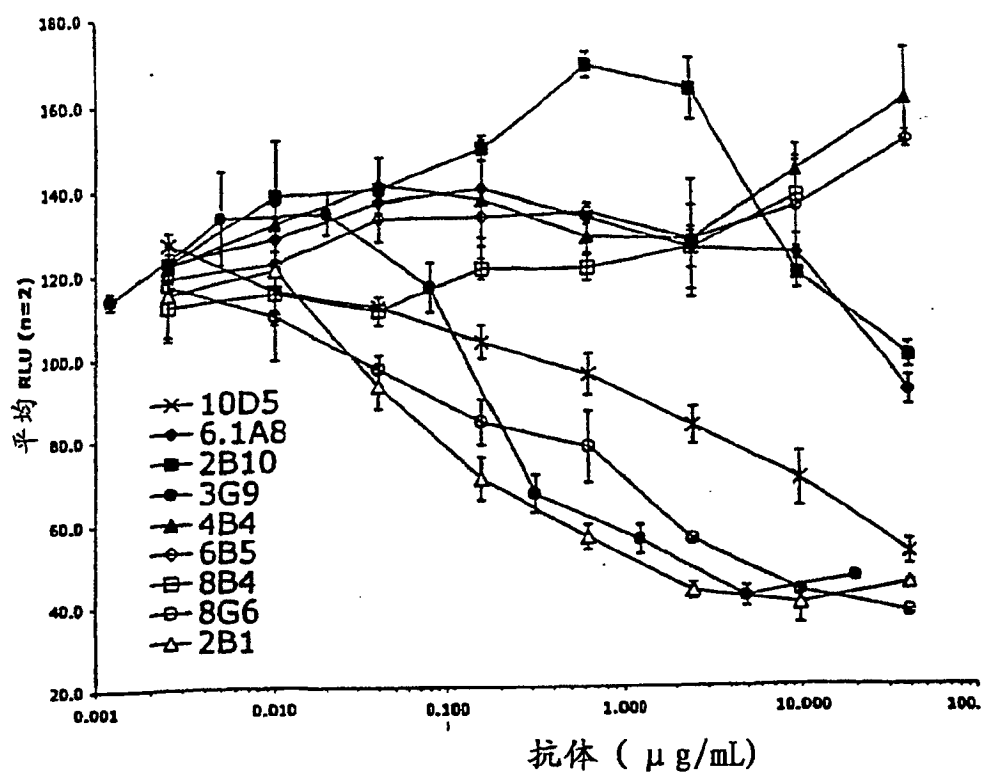


图 6A

TGF β 由 $\alpha v \beta 6$ - 激活的抑制-融合#7mAbs
(PAI-1 荧光素酶共培养生物测定)

PAI-1 荧光素酶共培养物测定
纯化的融合7Mabs

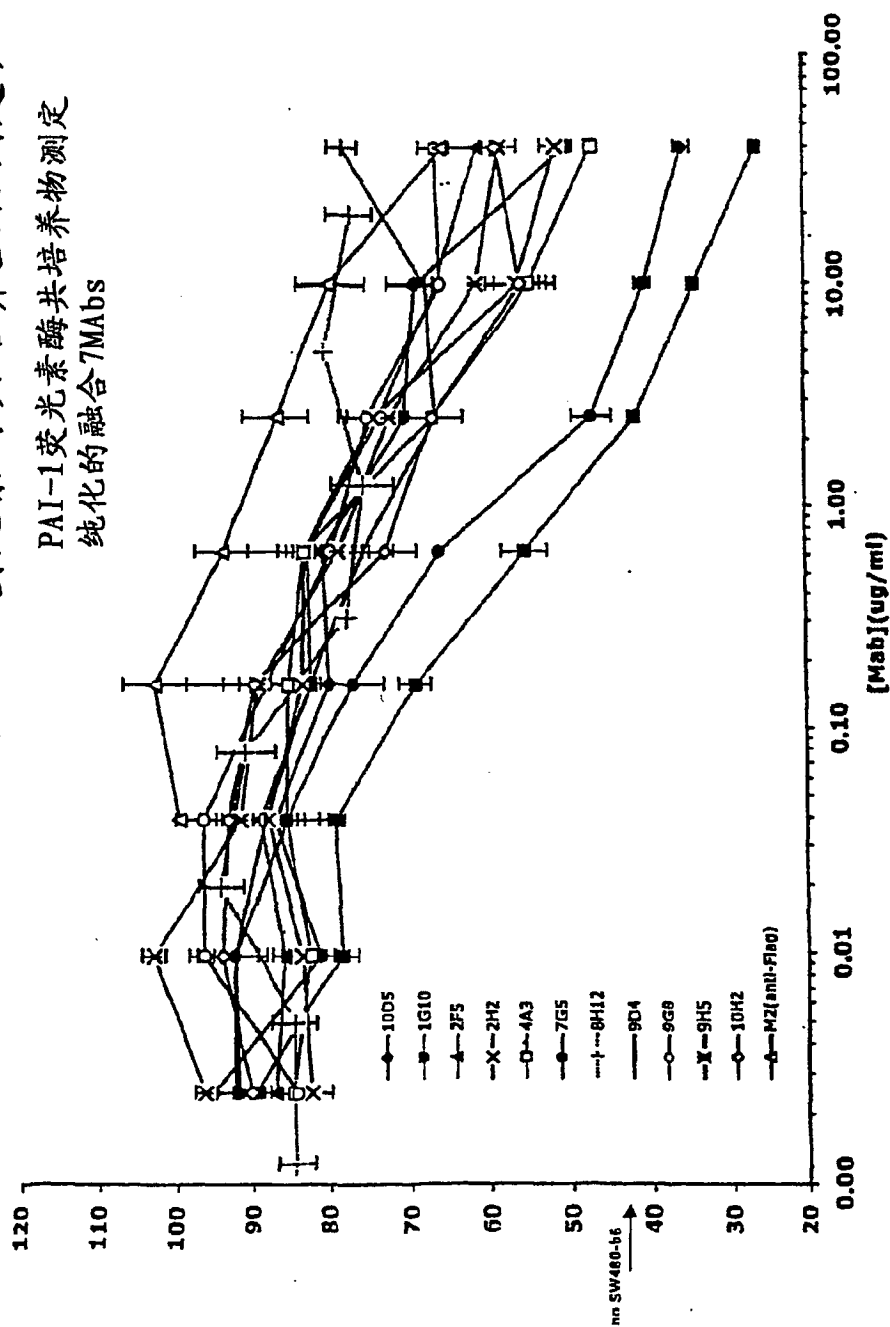


图 6B

6.1A8	(1)	QVQFQSGPELV	RPGVSVKLSCKGS	SYTFTDYTHH	VKLSHAKTLEWIG	VI DTYG KTNYN QKFEG	KA TMTVDKSSSTAYNDLARLTSEDSAV
6.8G6-A	(1)	QVQFQSGPELV	RPGVSVKLSCKGS	SYTFTDYAMH	VKLSHAKSLEWIG	VI STYXNTNYN QKFEG	KA TMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAV
6.8G6-B	(1)	QVQFQSGPELV	RPGVSVKLSCKGS	SYTFTDYAMH	VKLSHAKSLEWIG	VI STYXNTNYN QKFEG	KA TMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAV
7.7G5	(1)	QVQFQSGPELV	KPGASVKLSCKAS	GYFTGYFMMN	VMQSHGKSLEWIG	I KPYNGDNFYN QKFEG	KA TMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAV
6.2B1	(1)	EVLVESGGGLV	KPGASVKLSCKAS	GYFTFSYVMS	SVRQTPKRLLEWAS	ISSG-GSTYYP DSVKGR	FTISRDSARNILYLQMSLSRSEDIA
6.3G9	(1)	EVLVESGGGLV	KPGASVKLSCKAS	GYFTFSYVMS	SVRQTPKRLLEWAS	ISSG-GSTYYP DSVKGR	FTISRDSARNILYLQMSLSRSEDIA
6.2B10-A	(1)	QVQFQSGPELV	RPGTSVKLSCKAS	GYFTSYWMN	VKQRPQGLEWIG	I HPSIS ETRLN P KFKD	KA TLTVDTSSTVYVQMSLSRSEDIA
6.2B10-B	(1)	QVQFQSGPELV	RPGTSVKLSCKAS	GYFTSYWMN	VKQRPQGLEWIG	I HPSIS ETRLN P KFKD	KA TLTVDTSSTVYVQMSLSRSEDIA
6.2G2	(1)	QVQFQSGPELV	RPGTSVKLSCKAS	GYFTSYWMN	VKQRPQGLEWIG	I HPSIS ETRLN P KFKD	KA TLTVDTSSTVYVQMSLSRSEDIA
6.2A1	(1)	QVQFQSGPELV	RPGTSVKLSCKAS	GYFTSYWMN	VKQRPQGLEWIG	I HPSIS ETRLN P KFKD	KA TLTVDTSSTVYVQMSLSRSEDIA
6.4B4-A	(1)	QVQFQSGPELV	RPGTSVKLSCKAS	GYFTSYWMN	VKQRPQGLEWIG	I HPSIS ETRLN P KFKD	KA TLTVDTSSTVYVQMSLSRSEDIA
6.4B4-B	(1)	QVQFQSGPELV	RPGTSVKLSCKAS	GYFTSYWMN	VKQRPQGLEWIG	I HPSIS ETRLN P KFKD	KA TLTVDTSSTVYVQMSLSRSEDIA
6.4B4-C	(1)	QVQFQSGPELV	RPGTSVKLSCKAS	GYFTSYWMN	VKQRPQGLEWIG	I HPSIS ETRLN P KFKD	KA TLTVDTSSTVYVQMSLSRSEDIA
7.1012	(1)	QVQFQSGPELV	RPGTSVKLSCKAS	GYFTSYWMN	VKQRPQGLEWIG	I HPSIS ETRLN P KFKD	KA TLTVDTSSTVYVQMSLSRSEDIA
7.9H5	(1)	QVQFQSGPELV	RPGTSVKLSCKAS	GYFTSYWMN	VKQRPQGLEWIG	I HPSIS ETRLN P KFKD	KA TLTVDTSSTVYVQMSLSRSEDIA
7.4A3-A	(1)	QVQFQSGPELV	RPGTSVKLSCKAS	GYFTSYWMN	VKQRPQGLEWIG	I HPSIS ETRLN P KFKD	KA TLTVDTSSTVYVQMSLSRSEDIA
7.4A3-B	(1)	QVQFQSGPELV	RPGTSVKLSCKAS	GYFTSYWMN	VKQRPQGLEWIG	I HPSIS ETRLN P KFKD	KA TLTVDTSSTVYVQMSLSRSEDIA
7.1C5-A	(1)	QVQFQSGPELV	RPGTSVKLSCKAS	GYFTSYWMN	VKQRPQGLEWIG	I HPSIS ETRLN P KFKD	KA TLTVDTSSTVYVQMSLSRSEDIA
7.1C5-B	(1)	QVQFQSGPELV	RPGTSVKLSCKAS	GYFTSYWMN	VKQRPQGLEWIG	I HPSIS ETRLN P KFKD	KA TLTVDTSSTVYVQMSLSRSEDIA
7.1G10	(1)	QVQFQSGPELV	RPGTSVKLSCKAS	GYFTSYWMN	VKQRPQGLEWIG	I HPSIS ETRLN P KFKD	KA TLTVDTSSTVYVQMSLSRSEDIA
6.1A8	(94)	YFCARGGFRGDR	PSLRVYAMD	WGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:19		
6.8G6-A	(94)	YFCARGGFRGDR	PSLRVYAMD	WGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:20		
6.8G6-B	(94)	YFCARGGFRGDR	PSLRVYAMD	WGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:21		
7.7G5	(94)	YFCARGGFRGDR	PSLRVYAMD	WGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:22		
6.2B1	(93)	YFCARGGFRGDR	PSLRVYAMD	WGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:23		
6.3G9	(93)	YFCARGGFRGDR	PSLRVYAMD	WGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:24		
6.2B10-A	(94)	YFCARGGFRGDR	PSLRVYAMD	WGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:25		
6.2B10-B	(94)	YFCARGGFRGDR	PSLRVYAMD	WGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:26		
6.2G2	(94)	YFCARGGFRGDR	PSLRVYAMD	WGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:61		
6.2A1	(94)	YFCARGGFRGDR	PSLRVYAMD	WGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:62		
6.4B4-A	(93)	YFCARGGFRGDR	PSLRVYAMD	WGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:27		
6.4B4-B	(93)	YFCARGGFRGDR	PSLRVYAMD	WGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:28		
6.4B4-C	(93)	YFCARGGFRGDR	PSLRVYAMD	WGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:29		
7.10H2	(94)	YFCARGGFRGDR	PSLRVYAMD	WGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:30		
7.9H5	(94)	YFCARGGFRGDR	PSLRVYAMD	WGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:31		
7.4A3-A	(94)	YFCARGGFRGDR	PSLRVYAMD	WGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:32		
7.4A3-B	(94)	YFCARGGFRGDR	PSLRVYAMD	WGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:33		
7.1C5-A	(94)	YFCARGGFRGDR	PSLRVYAMD	WGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:34		
7.1C5-B	(94)	YFCARGGFRGDR	PSLRVYAMD	WGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:35		
7.1G10	(94)	YFCARGGFRGDR	PSLRVYAMD	WGQGTSTVTVSS	SEQ ID NO:36		

图 7A

6.1A8	(1)	DIVLTQSPASLAVSLQQRATIS	CRASQSVSIST-YSYI	IHWFQQKPGQPPKLLIKYASN	ESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTAIYYC
6.8G6	(1)	DIVLTQSPASLAVSLQQRATIS	CRASQSVSTSS-YSYMYWY	QQKPGQSPKFLIKYASN	ESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTAIYYC
6.4B4	(1)	DVMTQTPRSLPVSGLDQASMS	CRSSQSLKHSNGDTY	LHWYLQKPGQSPNLLIYKVSNR	FSGVDPDRFSGSGSGTEFTFKISRVEAEDLGVYFC
6.2A1	(1)	DIVMTQSHKFMSTVGDVRSITC	KASLDVR-----	TAVAWYQQKPGQSPKLLIYSA	SYRTGVDPDRFTGSGSGTDFTFNIRSVQAEDLAVYYC
6.2G2	(1)	DIVMTQSHKFMSTVGDVRSITC	KASQAVN-----	TAVAWYQQKPGQSPKLLIYSA	SYQYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC
7.1C5	(1)	DIQMTQSPSSLSASLGERVNLTC	RASQEISG-----	YLSWLQQKPDGTIKRLIYA	AATLDGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFDYVC
7.1G10	(1)	DIQMTQSPSSLSASLGERVNLTC	RASQEISG-----	YLSWLQQKPDGTIKRLIYA	AATLDGVPKRFSGSRSGADYSLTISSLESEDFADYYC
6.2B10	(1)	QIVLTQSPAIMASAPGKVTMTCS	ASSVS-----	YMHWYQQKSGTSPRRMIYD	TSKLAGVPAFSGSGSGTSSYSLTISSMEAVDAATYYC
7.7G5	(1)	QIVLTQSPAIMASAPGKVTMTCS	ASSVS-----	YMHWYQQKSGTSPRRMIYD	TSKLAGVPAFSGSGSGTSSYSLTISSMEADAATYYC
6.2B1	(1)	QIVLTQSPAIMASAPGKVTMTCS	ASSVS-----	YLYWYQQKPGSSPKLWIYST	SNLAGRVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMEADAASYFC
6.3G9	(1)	QIVLTQSPAIMASAPGKVTMTCS	ASSVS-----	YLYWYQQKSGSSPKLWIYST	SNLAGRVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMEADAASYFC

6.1A8	(93)	QHSWEIPTYT	FGGGTKVEIK	SEQ ID NO:37
6.8G6	(93)	QHNWEIPFT	FGGGTKLEIK	SEQ ID NO:38
6.4B4	(94)	SQSTHVPTYT	FGGGTRLEIK	SEQ ID NO:39
6.2A1	(89)	QQHYGIPWT	FGGGTKLEIK	SEQ ID NO:63
6.2G2	(89)	QHGYGVPT	FGGGTKLEIK	SEQ ID NO:64
7.1C5	(89)	LQYASYPTYT	FGGGAKLEIK	SEQ ID NO:40
7.1G10	(89)	LQYATYPYT	FGGGTKLEIK	SEQ ID NO:41
6.2B10	(88)	QQWTSNPFT	FGSGTKLGIK	SEQ ID NO:42
7.7G5	(88)	QQWSSHPPPT	FGAGTKLELK	SEQ ID NO:43
6.2B1	(90)	HQWSSYPPT	FGGGTKLEIK	SEQ ID NO:44
6.3G9	(90)	HQWSTYRPT	FGGGTKLEIK	SEQ ID NO:45

图 7B

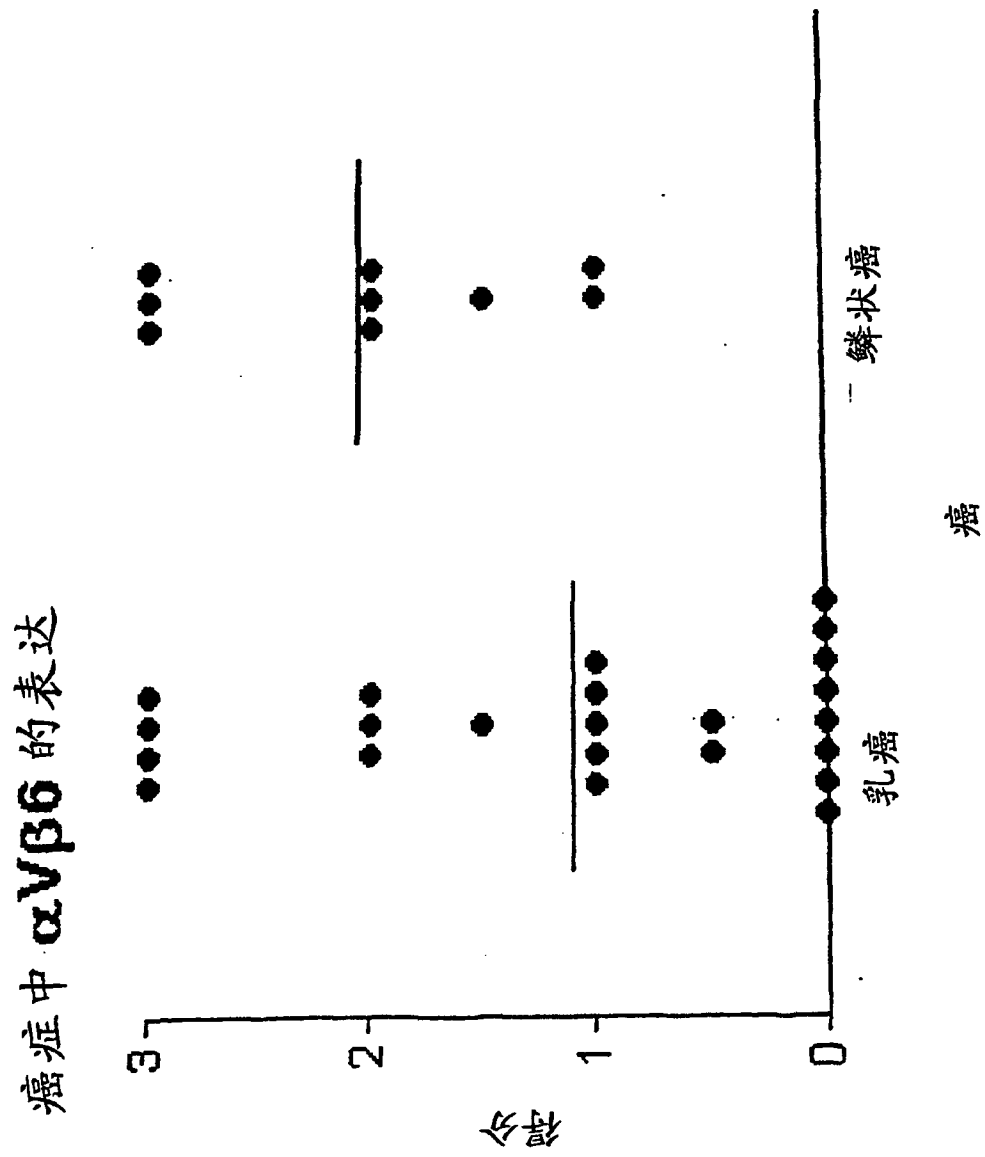


图 8

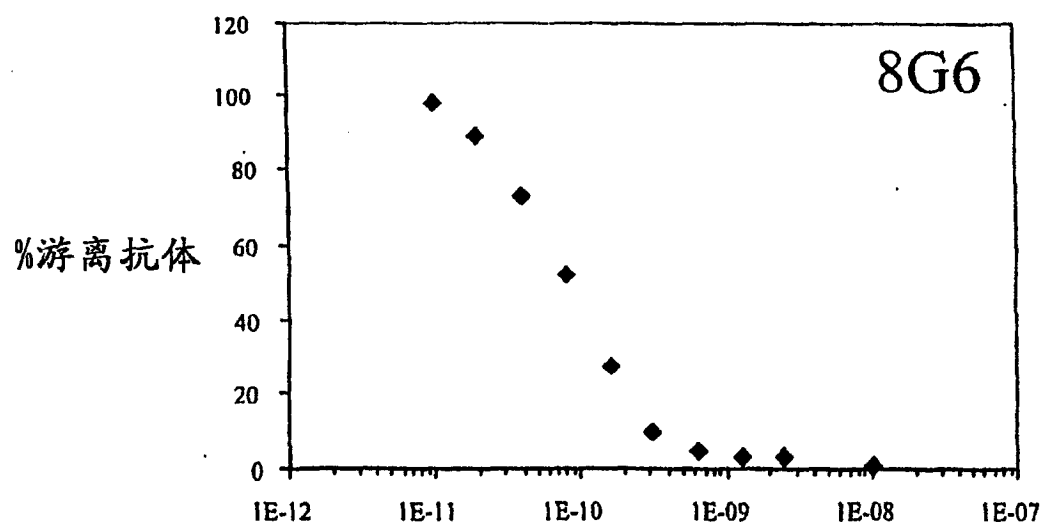


图 9A

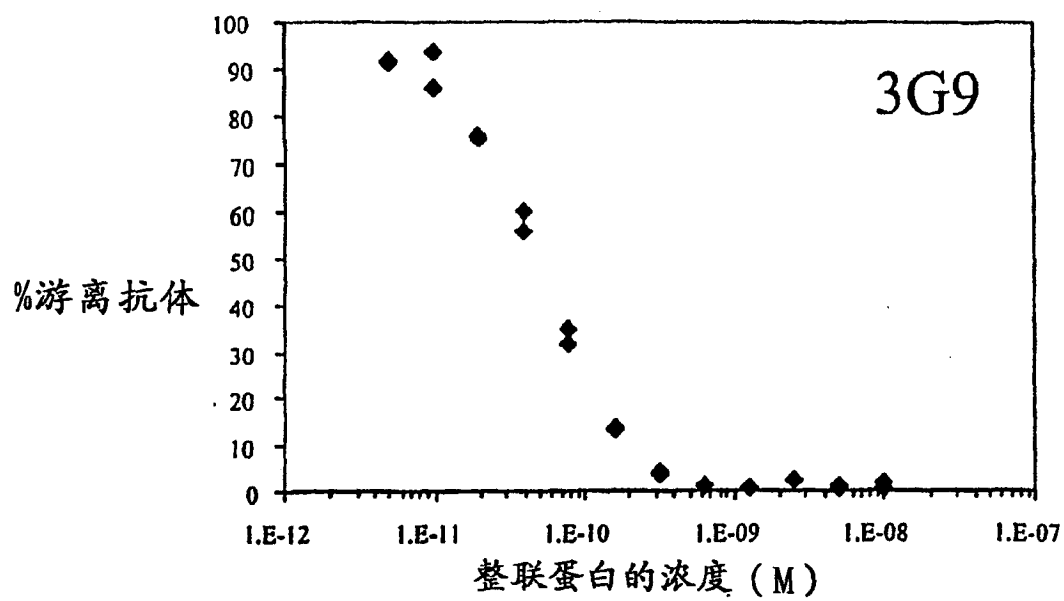


图 9B

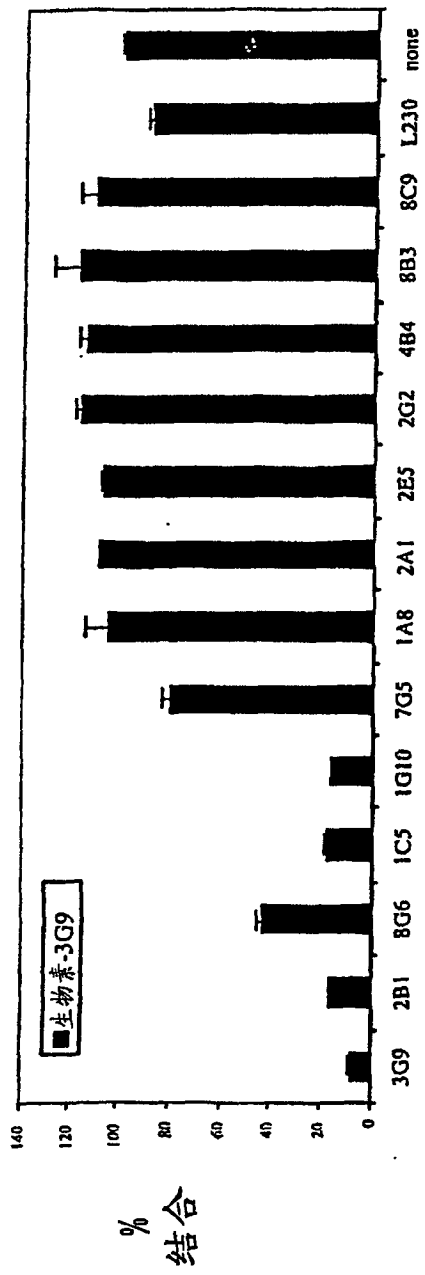
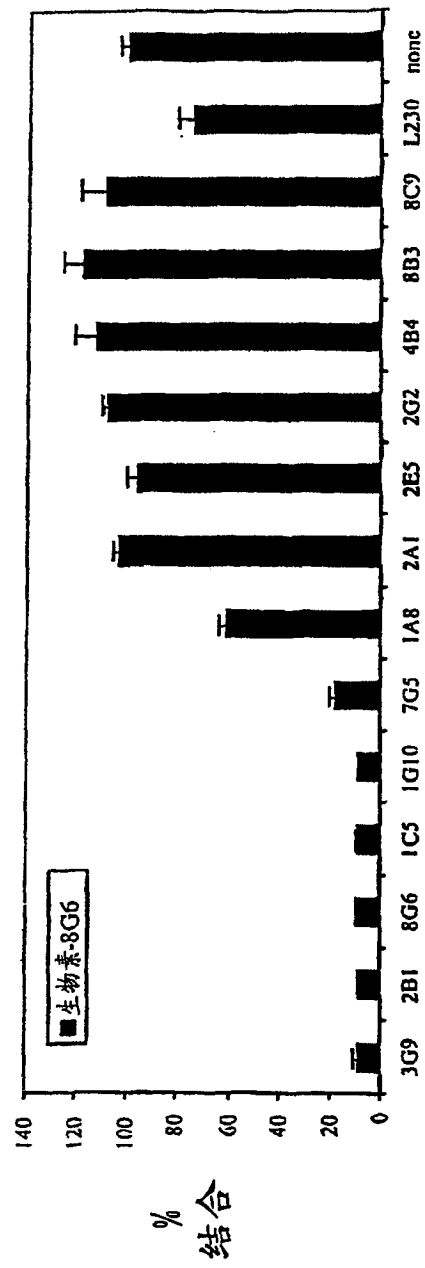


图 10A



未标记的竞争物

图 10B

$\alpha_v\beta_6$ mAbs 对 UUO 中平滑肌肌动蛋白染色作用

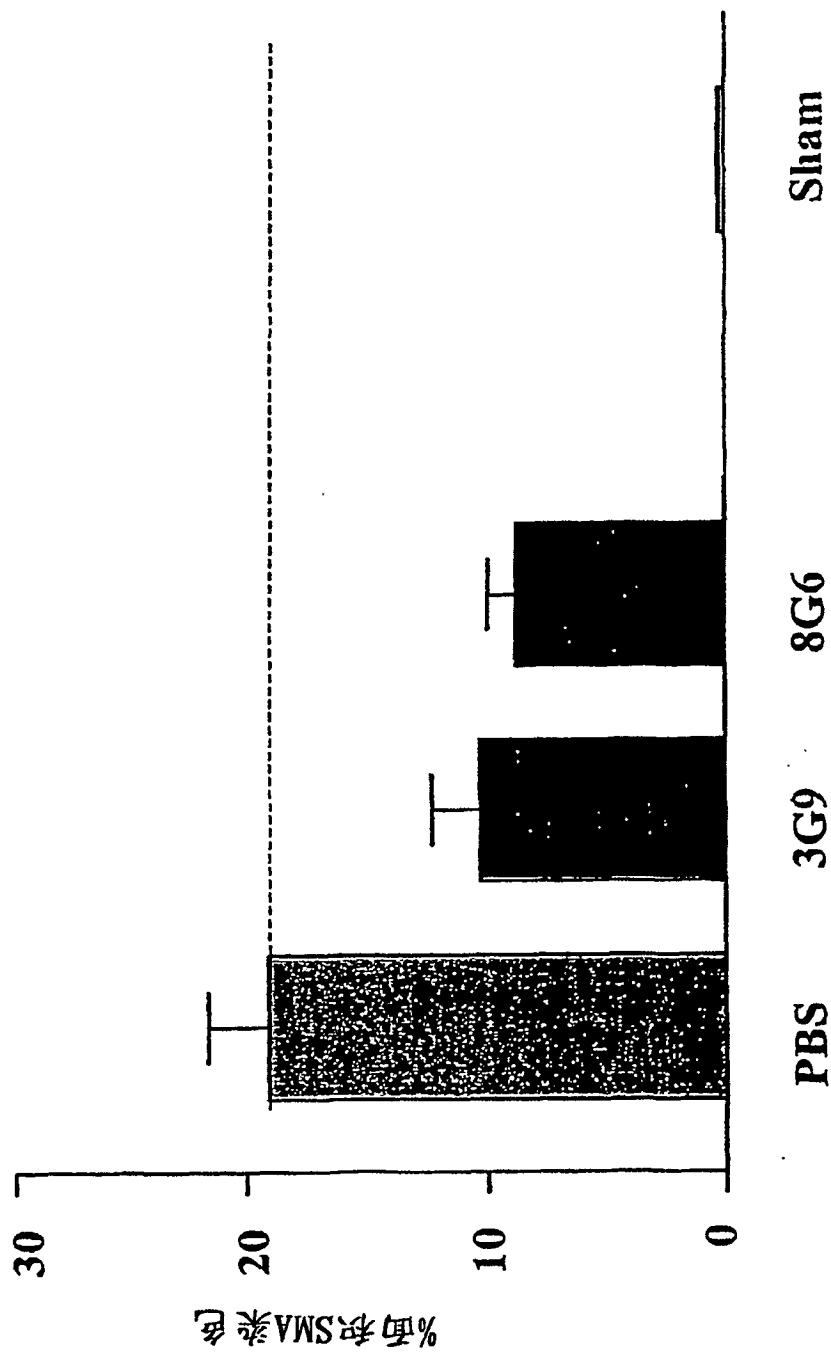


图 11

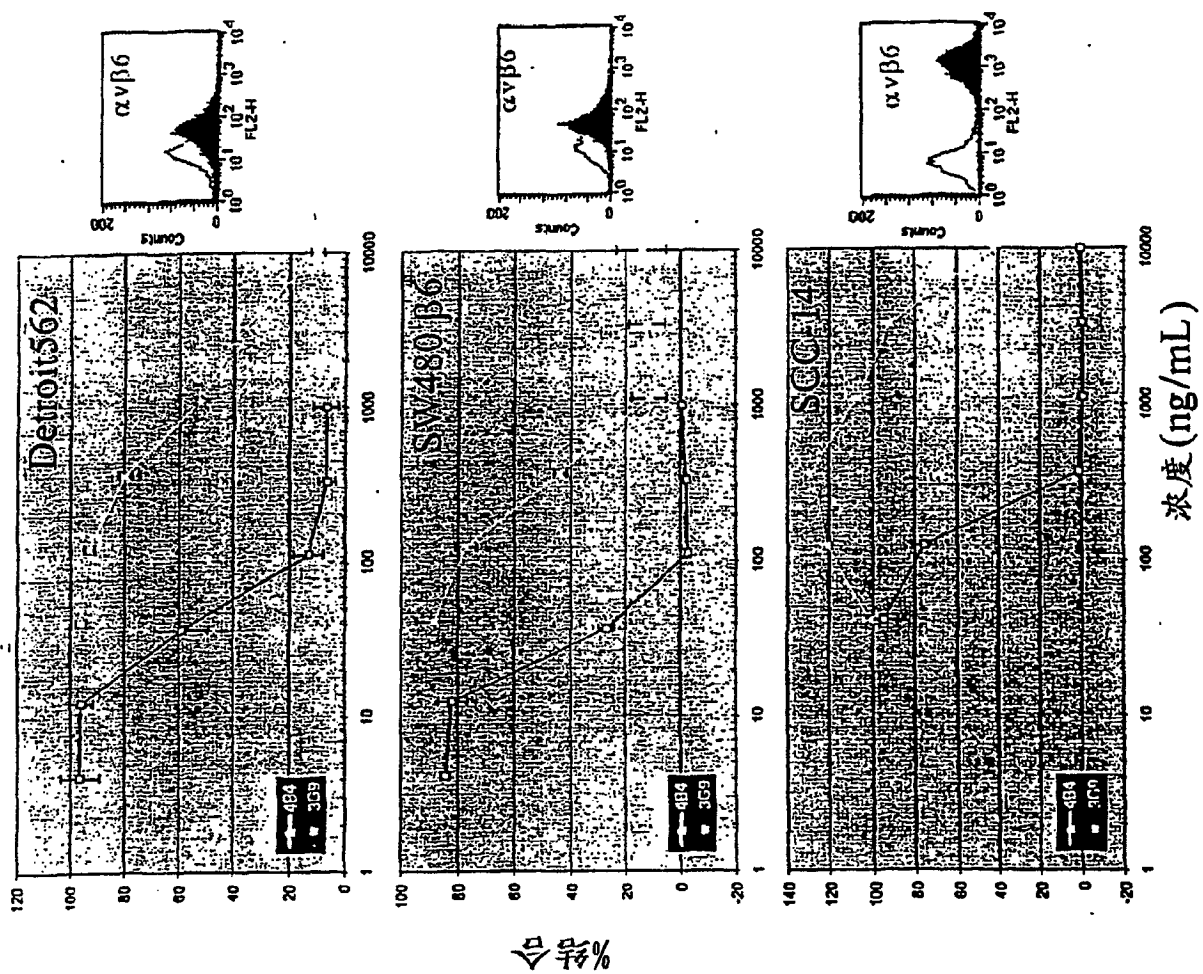


图 12

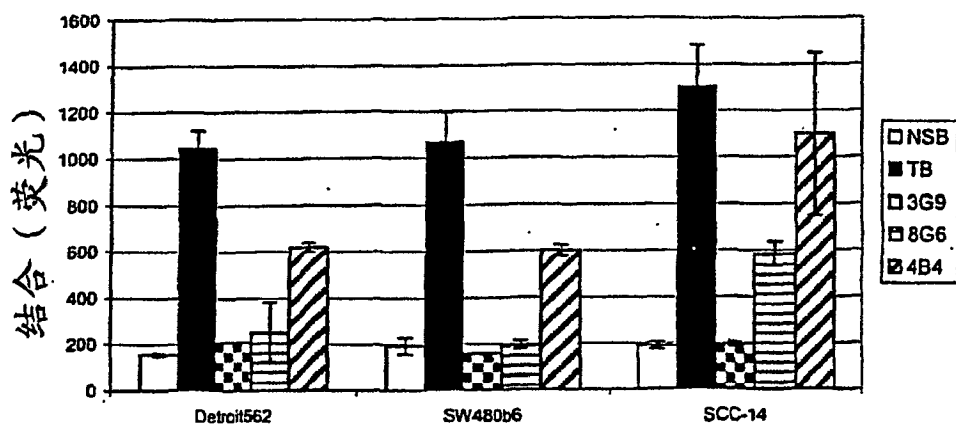


图 13

皮下植入的Detroit562, 人咽癌细胞系, 对采用
3G9的 α v β 6mAbs疗法的反应

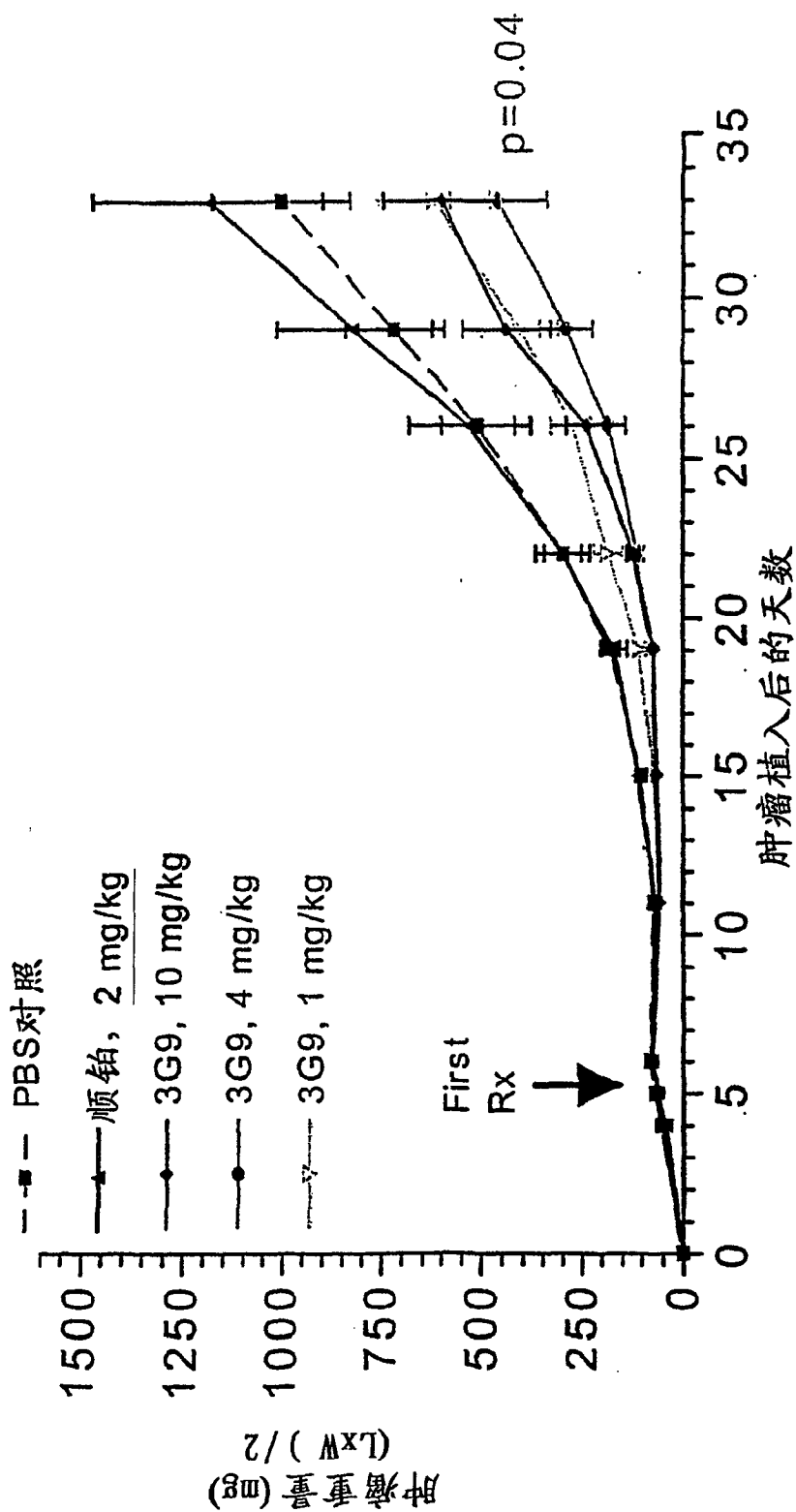


图 14A

皮下植入Detroit562, 人咽癌细胞系, 对采用
4B4的 α v β 6mAbs疗法的反应

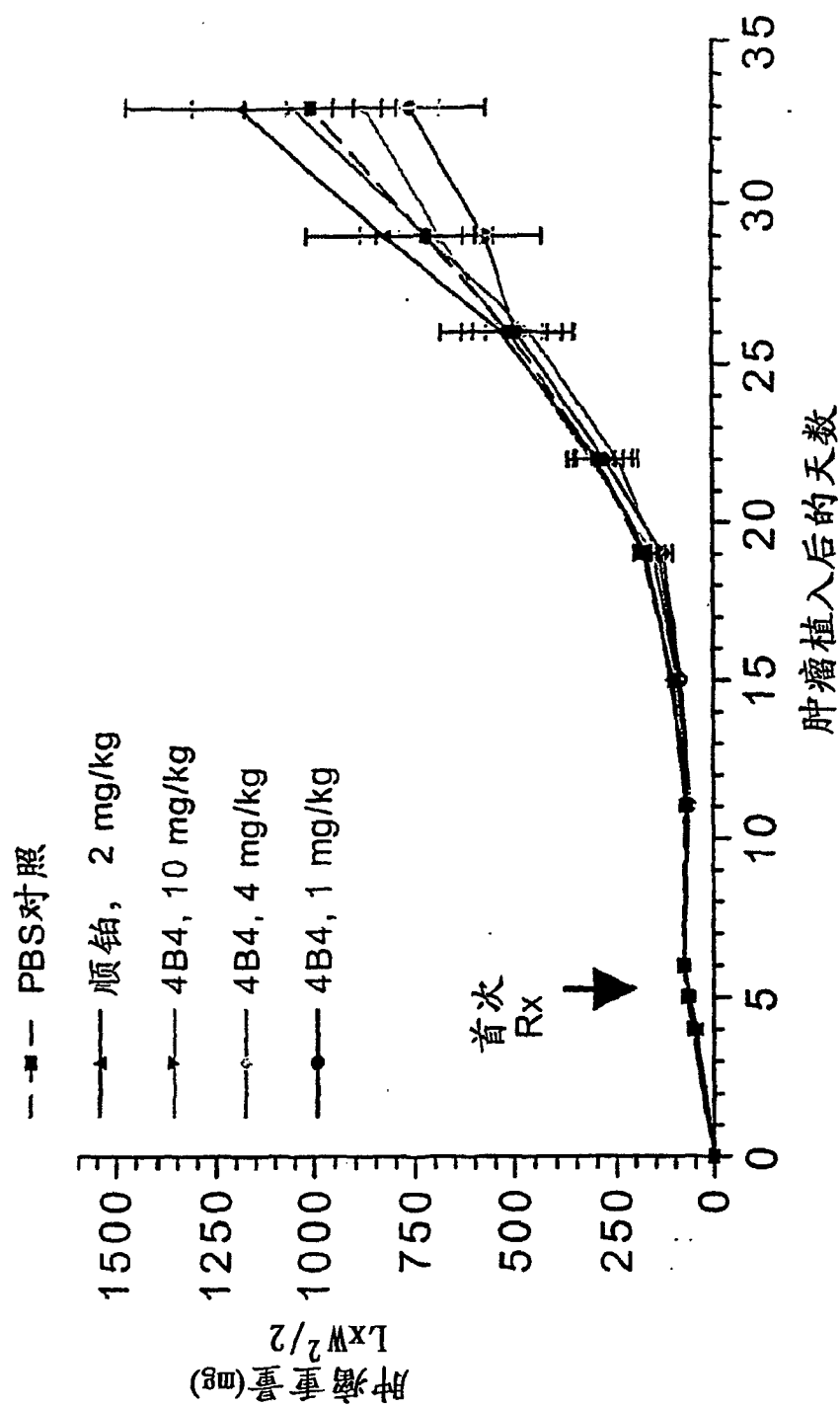


图 14B

博来霉素肺纤维化实验

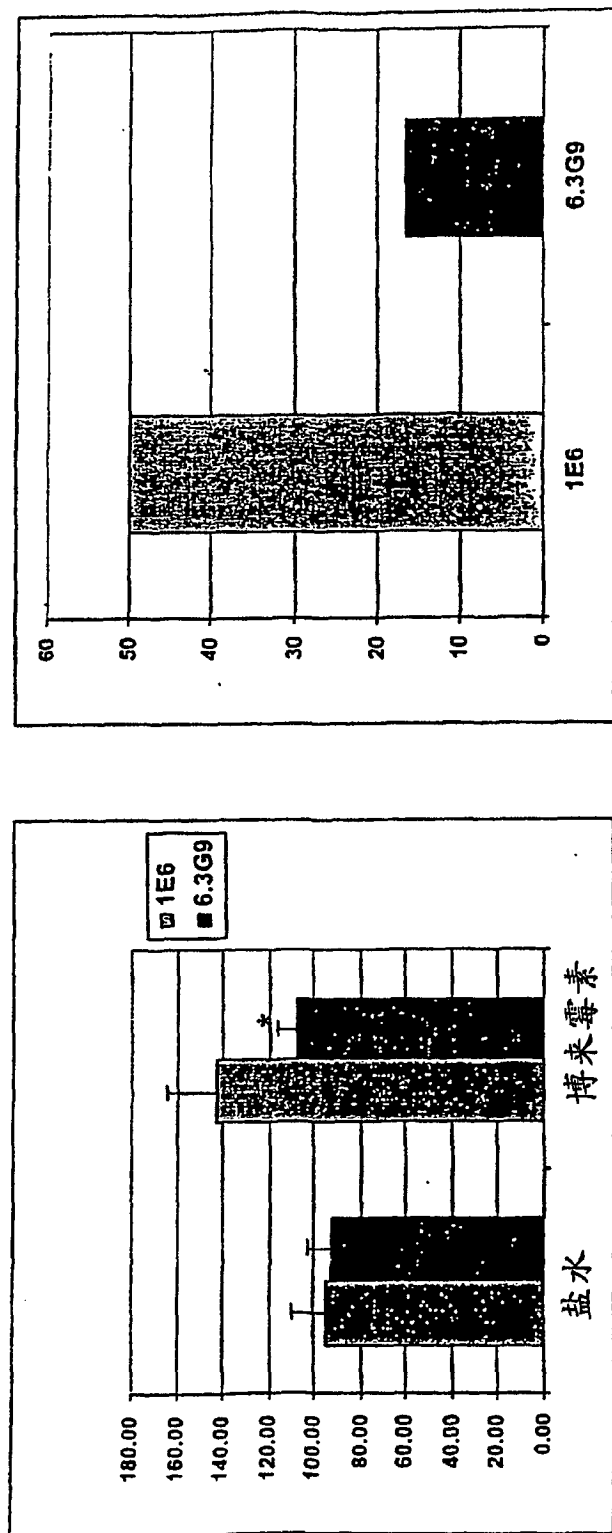
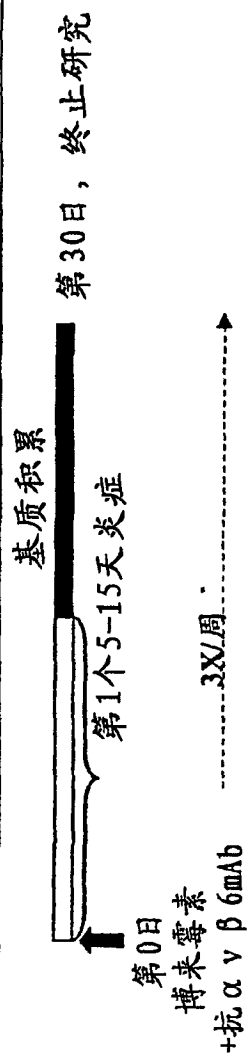


图 15A

博来霉素肺纤维化实验

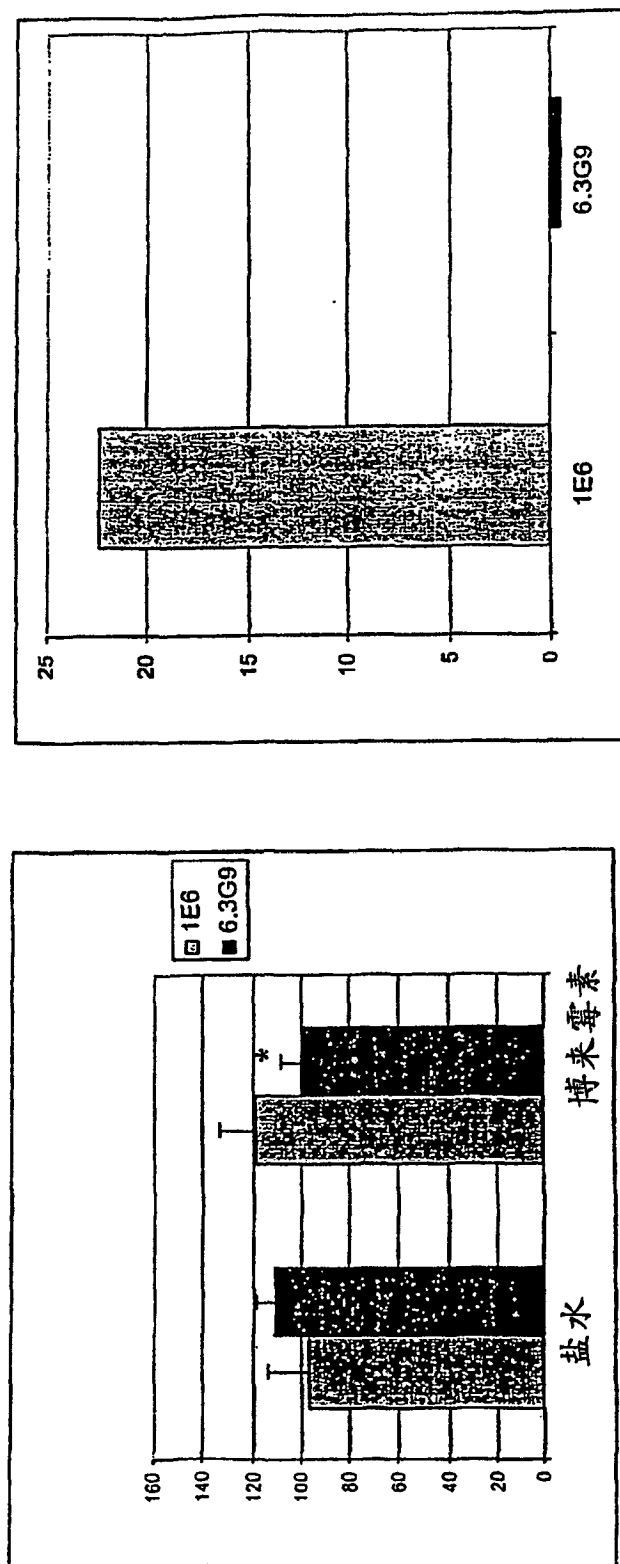
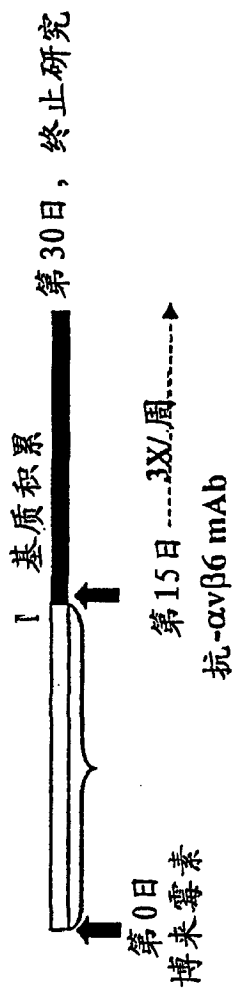


FIG. 15B

图 15B

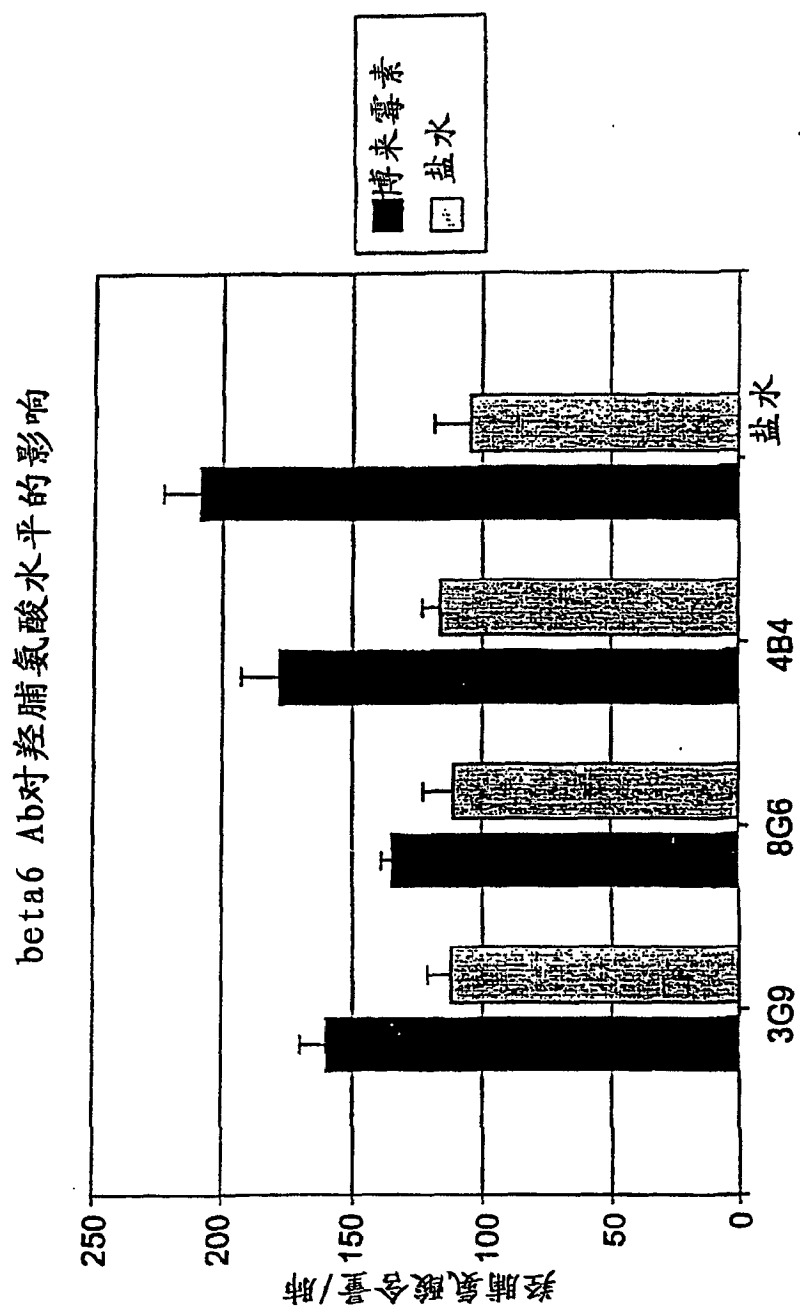


图 15C