



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101448858 B

(45) 授权公告日 2013.06.12

(21) 申请号 200780018402.2

(22) 申请日 2007.03.21

(30) 优先权数据

60/871,743 2006.12.22 US

60/784,704 2006.03.21 US

60/785,330 2006.03.22 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008.11.20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/064572 2007.03.21

(87) PCT申请的公布数据

W02008/060645 EN 2008.05.22

(73) 专利权人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 阿南·丘撒拉佩 格雷格·普洛曼

马克·特西尔-拉维格尼 吴雁

叶伟兰

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2004056308 A2, 2004.07.08, 实施例 1, 7.

Mould A P et al. Defining the topology of integrin alpha5beta1-fibronectin interactions using inhibitory anti-alpha5 and anti-beta1 monoclonal antibodies. Evidence that the synergy sequence of fibronectin is recognized by the amino-terminal repeats of the alpha5 subunit. 《The journal of biological chemistry》. 1997, 第 272 卷 (第 28 期), 全文.

Burrows L et al. Fine mapping of inhibitory anti-alpha5 monoclonal antibody epitopes that differentially affect integrin-ligand binding. 《The biochemical journal》. 1999, 第 344 卷全文.

Orecchia angela et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 is deposited in the extracellular matrix by endothelial cells and is a ligand for the alpha5beta1 integrin. 《Journal of cell science》. 2003, 第 116 卷 (第 17 期), 全文.

审查员 黎舒婷

权利要求书3页 说明书51页

序列表6页 附图13页

(54) 发明名称

牵涉 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂的联合疗法

(57) 摘要

本发明涉及 VEGF 拮抗剂和 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂用于治疗癌症和抑制血管发生和 / 或血管通透性 (包括抑制疾病中的异常血管发生) 的用途。本发明还涉及 VEGFR 激动剂 $\alpha 5 \beta 1$ 激动剂用于促进血管发生和血管通透性的用途。本发明还涉及新的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体、包含它们的组合物和试剂盒、及制备和使用它们的方法。

CN 101448858 B

1. 一种抗体,其包含重链可变域和轻链可变域,该重链可变域和轻链可变域包含与由下述杂交瘤生成的抗 $\alpha 5\beta 1$ 抗体的六个高变区 (HVR) 对应的六个 HVR,其中所述抗体能结合人 $\alpha 5\beta 1$ 和竞争性抑制由下述杂交瘤生成的抗 $\alpha 5\beta 1$ 抗体对人 $\alpha 5\beta 1$ 的结合,其中所述杂交瘤选自 2006 年 3 月 7 日在 ATCC 作为 ATCC No. PTA-7421 保藏的杂交瘤和作为 ATCC No. PTA-7420 保藏的杂交瘤。

2. 一种抗体,其包含由 2006 年 3 月 7 日在 ATCC 作为 ATCC No. PTA-7421 保藏的杂交瘤生成的抗体的重链可变域 (VH) 和轻链可变域 (VL) 序列。

3. 一种抗体,其包含由 2006 年 3 月 7 日在 ATCC 作为 ATCC No. PTA-7420 保藏的杂交瘤生成的抗体的重链可变域 (VH) 和轻链可变域 (VL) 序列。

4. 依照权利要求 1-3 任一项的抗体,其中该抗体是人源化抗体或嵌合抗体。

5. 依照权利要求 1 的抗体,其中该抗体能以介于 500nM 和 1pM 之间的 Kd 结合人 $\alpha 5\beta 1$ 或 $\alpha 5$ 。

6. 依照权利要求 1 的抗体,其中该抗体不能结合 $\alpha V\beta 3$ 或 $\alpha V\beta 5$ 或 $\alpha V\beta 1$ 。

7. 依照权利要求 1-3 任一项的抗体,其中该抗体包含人 IgG 的 Fc 序列。

8. 依照权利要求 7 的抗体,其中所述人 IgG 是 IgG1 或 IgG4。

9. 依照权利要求 7 的抗体,其中该抗体包含缺乏抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 效应器功能的 Fc 序列。

10. 依照权利要求 1-3 任一项的抗体,其中该抗体选自 Fab、Fab'、F(ab)'₂、单链 Fv(scFv)、Fv 片段、和双抗体。

11. 依照权利要求 1-3 任一项的抗体,其中该抗体是线性抗体。

12. 依照权利要求 1-3 任一项的抗体,其中该抗体是多特异性抗体。

13. 一种偶联物,其包含依照权利要求 1-12 任一项的抗体和治疗剂。

14. 依照权利要求 13 的偶联物,其中所述治疗剂选自细胞毒剂、放射性同位素和化疗剂。

15. 一种偶联物,其包含依照权利要求 1-12 任一项的抗体和标记物。

16. 依照权利要求 15 的偶联物,其中所述标记物选自放射性同位素、荧光染料和酶。

17. 一种分离的核酸分子,其编码权利要求 1-12 任一种抗体的重链可变域 (VH) 和 / 或轻链可变域 (VL)。

18. 一种表达载体,其包含权利要求 17 的核酸分子。

19. 一种细胞,其包含权利要求 17 的核酸分子。

20. 依照权利要求 19 的细胞,其中所述细胞是 2006 年 3 月 7 日在 ATCC 作为 ATCC No. PTA-7421 保藏的杂交瘤或作为 ATCC No. PTA-7420 保藏的杂交瘤。

21. 一种生产抗体的方法,包括 (a) 培养包含编码权利要求 1-12 任一项的抗体的核酸分子的细胞,并 (b) 回收由该细胞生成的抗体。

22. 一种组合物,其包含权利要求 1-12 任一项的抗体及药学可接受载体。

23. 依照权利要求 1-12 任一项的抗体在制备用于检测来自患者的样品中的 $\alpha 5\beta 1$ 蛋白质的试剂中的用途,其中检测包括使抗体接触样品,并检测结合至 $\alpha 5\beta 1$ 蛋白质的抗 $\alpha 5\beta 1$ 抗体。

24. 依照权利要求 23 的用途,其中所述抗体在免疫组化 (IHC) 测定法中或在 ELISA 测

定法中使用。

25. 依照权利要求 1-12 任一项的抗体在制备用于抑制受试者中的血管发生和 / 或血管通透性的药物中的用途。

26. 依照权利要求 1-12 任一项的抗体在制备用于治疗受试者中的疾病的药物中的用途,其中所述疾病具有异常血管发生或血管通透性。

27. 依照权利要求 1-12 任一项的抗体在制备用于抑制患有疾病的受试者中的血管发生和 / 或血管通透性的药物中的用途,其中所述药物与 VEGF 拮抗剂组合使用,所述疾病具有异常血管发生或血管通透性。

28. 权利要求 27 的用途,其中所述疾病选自癌症、眼病、和自身免疫病。

29. 依照权利要求 27 的用途,其中给所述受试者先施用 VEGF 拮抗剂,后施用抗体。

30. 依照权利要求 27 的用途,其中给所述受试者同时施用 VEGF 拮抗剂和抗体。

31. 依照权利要求 27 的用途,其中将受试者用 VEGF 拮抗剂治疗,直至受试者对 VEGF 拮抗剂治疗没有响应,然后将受试者用抗体治疗。

32. 依照权利要求 27 的用途,其中所述疾病是癌症且将受试者在所述癌症是非侵入性的时候用 VEGF 拮抗剂治疗,而在所述癌症是侵入性的时候用抗体治疗。

33. 依照权利要求 27 的用途,其中所述受试者在患病组织中来自未患有该病的受试者的组织相比具有升高的 $\alpha 5 \beta 1$ 水平。

34. 依照权利要求 27 的用途,其中给受试者进一步施用选自下组的治疗剂:抗肿瘤剂、化疗剂、生长抑制剂和细胞毒剂。

35. 依照权利要求 27 的用途,其中所述 VEGF 拮抗剂是抗 VEGF 抗体,其中所述抗 VEGF 抗体对人 VEGF 的结合受到贝伐单抗的竞争性抑制。

36. 依照权利要求 27 的用途,其中所述 VEGF 拮抗剂是抗 VEGF 抗体。

37. 依照权利要求 27 的用途,其中所述抗体偶联至细胞毒剂。

38. 依照权利要求 37 的用途,其中所述细胞毒剂是放射性同位素、化疗剂或毒素。

39. 依照权利要求 36 的用途,其中所述抗 VEGF 抗体是贝伐单抗。

40. 依照权利要求 36 的用途,其中所述抗 VEGF 抗体是人源化抗体或人抗体。

41. 依照权利要求 27 的用途,其中所述抗体是人源化抗体或人抗体。

42. 一种组合物,其包含权利要求 1-12 任一项的抗体、VEGF 拮抗剂、及制药学可接受载体。

43. 一种用于检测已经用 VEGF 拮抗剂治疗过的受试者中的 $\alpha 5 \beta 1$ 的试剂盒,其包含权利要求 1-12 任一项的抗体,及使用该抗体检测已经用 VEGF 拮抗剂治疗过的受试者中的 $\alpha 5 \beta 1$ 的说明书。

44. 依照权利要求 42 的组合物在制备用于抑制患有具有异常血管发生或血管通透性的疾病的受试者中的血管发生和 / 或血管通透性的药物中的用途。

45. 依照权利要求 44 的用途,其中所述疾病选自癌症、眼病、自身免疫病。

46. 依照权利要求 27 或 44 的用途,其中所述疾病选自实体瘤、转移瘤、软组织肿瘤、具有眼新血管形成的疾病、具有异常血管发生的炎性疾病、移植入受试者后发生的疾病和具有纤维血管组织异常增殖的疾病。

47. 依照权利要求 28 或 45 的用途,其中所述疾病是癌症,其中所述癌症选自乳腺癌、宫

颈癌、结肠直肠癌、肺癌、非何杰金氏淋巴瘤 (NHL)、肾细胞癌、前列腺癌、肝癌、头颈癌、黑色素瘤、卵巢癌、间皮瘤、软组织癌、和多发性骨髓瘤。

48. 依照权利要求 27 或 44 的用途, 其中所述疾病选自视网膜病、年龄诱发的黄斑变性、发红、银屑病、炎性肾病、溶血性尿毒综合征、糖尿病肾病、关节炎、炎性肠病、慢性炎症、慢性视网膜剥离、角膜新血管形成、克罗恩氏病、近视、眼新血管病、佩吉特病、类天疱疮、多动脉炎、斯耶格伦氏综合征、溃疡性结肠炎、移植物排斥、肺部炎症、肾病综合征、水肿、与恶性肿瘤有关的腹水、中风、血管纤维瘤和新生血管性青光眼。

49. 依照权利要求 27 或 44 的用途, 其中所述疾病是银屑病关节炎、角膜移植片新血管形成、慢性葡萄膜炎、慢性玻璃体炎、角膜移植片排斥、或骨关节炎。

50. 依照权利要求 22 或 42 的组合物在制备用于抑制遭受激光放射状角膜切开术后视网膜新血管形成的受试者中的血管发生和 / 或血管通透性的药物中的用途。

51. 依照权利要求 22 或 42 的组合物在制备用于抑制遭受视网膜新血管形成的受试者中的血管发生和 / 或血管通透性的药物中的用途。

52. 权利要求 1-12 任一项的抗体在制备用于治疗患有疾病的受试者的药物中的用途, 其中所述受试者曾经对用 VEGF 拮抗剂治疗疾病有响应, 但是现在对 VEGF 拮抗剂部分有响应或不再有响应。

53. 依照权利要求 52 的用途, 其中所述受试者在患病组织中与来自未患有该病的受试者的组织相比具有升高的 $\alpha 5 \beta 1$ 水平。

54. 依照权利要求 52 的用途, 其中给受试者进一步施用选自下组的治疗剂: 抗肿瘤剂、化疗剂、生长抑制剂和细胞毒剂。

牵涉 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂的联合疗法

发明领域

[0001] 本发明涉及 VEGF 拮抗剂和 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂用于治疗癌症和抑制血管发生和 / 或血管通透性 (包括抑制疾病中的异常血管发生) 的用途。本发明还涉及 VEGFR 激动剂 $\alpha 5 \beta 1$ 激动剂用于促进血管发生和血管通透性的用途。本发明还涉及新的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体, 包含它们的组合物和试剂盒, 及制备和使用它们的方法。

[0002] 发明背景

[0003] VEGF-A 在病理性和非病理性血管发生中的重要作用已经得到了完全确立。在体内模型中施用 VEGF 诱导有力的血管发生应答 (Plouet, J et al., (1989)EMBO J. 8 : 3801-3808 ;Leung, D. W., et al., (1989)Science 246 :1306-1309)。在小鼠中丧失单个 VEGF-A 等位基因引起胚胎致死性 (Carmeliet, P., et al., (1996)Nature 380 :435-439 ; Ferrara, N et al., (1996)Nature 380 :439-442)。还知道 VEGF 是血管通透性因子, 因为它有能力诱导血管渗漏 (Senger, D. R. et al., (1995)Science 219 :983-985 ;Dvorak, H. F., et al., (1995)Am. J. Pathol. 146 :1029-1039)。如此, 在其它非病理性血管发生之外, VEGF-A 牵涉发育的、生殖的和骨血管发生。

[0004] VEGF-A 能结合两种受体酪氨酸激酶 (RTK), 即 VEGFR-1 (Flt-1) 和 VEGFR-2 (KDR, Flk-1)。一般认为 VEGFR-2 是 VEGF-A 的有丝分裂、血管发生和通透性增强效应的主要介导体。在 2004 年 2 月, 美国食品和药品管理局 (FDA) 批准了贝伐单抗 (bevacizumab) (一种人源化抗 VEGF (血管内皮生长因子)-A 单克隆抗体) 联合基于 5- 氟尿嘧啶 (FU) 的化疗方案用于治疗转移性结肠直肠癌。后来, FDA 批准了 pegaptinib 用于治疗湿性 (新生血管性) 年龄相关黄斑变性 (AMD), pegaptinib 是一种能阻断 165 个氨基酸的 VEGF-A 同工型的适体。

[0005] 尽管有这些进步, 许多用 VEGF 拮抗剂治疗的患者最终死于他们的疾病。因此, 需要开发新的药物和治疗方法来治疗对 VEGF 拮抗剂疗法不再有响应或只有部分响应的疾病。还需要开发备选的和 / 或更好的疗法来治疗因异常血管发生而恶化、引起或招致的癌症和疾病。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明涉及用于治疗将会受益于血管发生降低、患有异常血管发生、和 / 或患有瘤形成的患者的药物和方法。依照一个实施方案, 本发明提供了用于抑制受试者中的血管发生和 / 或血管通透性的方法, 包括同时或顺次给受试者施用治疗有效量的 VEGF 拮抗剂和 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂的步骤。依照另一个实施方案, 本发明提供了用于治疗患有疾病的受试者的方法, 其中所述受试者曾经对用 VEGF 拮抗剂治疗疾病有响应, 但是现在对 VEGF 拮抗剂部分有响应或不再有响应, 所述方法包括给受试者施用治疗有效量的 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂的步骤。依照另一个实施方案, 本发明提供了用于治疗患有疾病的受试者的方法, 其中所述疾病对单独的或联合化疗的 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂疗法有抗性 or 耐药性, 所述方法包括给受试者施用治疗有效量的 VEGF 拮抗剂。

[0008] 本发明还涉及新的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体、包含它们的试剂盒和组合物、及制备或使用它

们的方法。依照一个实施方案,所述新的抗 $\alpha 5\beta 1$ 抗体是本文所述 7H5 抗体或 7H12 抗体、或其人源化形式或嵌合形式。依照另一个具体的实施方案,所述 7H5 抗体或 7H12 抗体、或其人源化形式或嵌合形式可以是 Fab、Fab'、F(ab)'₂、单链 Fv(scFv)、Fv 片段;双抗体、多特异性抗体和线性抗体的形式。依照另一个实施方案,所述新的抗 $\alpha 5\beta 1$ 抗体可以偶联至另一实体,诸如但不限于治疗剂或荧光染料或其它标志物,以检测患者中的或患者样品中的 $\alpha 5\beta 1$ 。此类新的 $\alpha 5\beta 1$ 抗体可用于多种治疗方法和诊断方法。例如,此类抗 $\alpha 5\beta 1$ 抗体可用于治疗异常血管发生、瘤形成、眼病和自身免疫病。此类抗体可用于检测患者中的或患者样品中的 $\alpha 5\beta 1$ 蛋白质,其通过使此类抗体接触患者中的或患者样品中的 $\alpha 5\beta 1$ 蛋白质,并定性或定量测定结合至 $\alpha 5\beta 1$ 蛋白质的抗 $\alpha 5\beta 1$ 抗体。

[0009] 依照又一个实施方案,本发明提供了用于治疗受试者中的癌症的方法,包括同时或顺次施用 VEGF 拮抗剂和 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗剂的步骤。依照一个优选的实施方案,所述癌症对 VEGF 拮抗剂疗法有响应。在另一个实施方案中,提供了治疗患有 AMD 的受试者中的年龄相关黄斑变性 (AMD) (包括湿性年龄相关黄斑变性) 的方法,包括同时或顺次施用治疗有效量的 VEGF 拮抗剂和 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗剂的步骤。在又一个实施方案中,提供了治疗受试者中的自身免疫病的方法,包括同时或顺次施用治疗有效量的 VEGF 拮抗剂和 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗剂的步骤。

[0010] 在一个实施方案中,待治疗的受试者可以首先施用 VEGF 拮抗剂,随后用 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗剂治疗。在另一个实施方案中,受试者同时用 VEGF 拮抗剂和 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗剂治疗。依照另一个实施方案,受试者用 VEGF 拮抗剂治疗,直至受试者对 VEGF 拮抗剂治疗没有响应,然后受试者用 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗剂治疗。在一个具体的实施方案中,受试者在所述癌症是非侵入性的或早期的时候用 VEGF 拮抗剂治疗,而在所述癌症是侵入性 (invasive) 的时候用 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗剂治疗。在另一个实施方案中,用 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗剂治疗的受试者在患病组织中与来自未患有该病的受试者的组织相比具有升高的 $\alpha 5\beta 1$ 水平。在这种情况下,所述方法可进一步包括检测受试者中的 $\alpha 5\beta 1$ 的步骤,例如在用 VEGF 拮抗剂治疗后在患病组织中。依照一个实施方案,所述侵入性癌症是转移癌。依照另一个实施方案,所述早期癌是通过辅助疗法 (例如化疗或手术切除) 治疗的癌症。

[0011] 在一个优选的实施方案中,所述受试者患有具有异常血管发生的疾病。依照另一个实施方案,所述疾病选自下组:癌症、自身免疫病或眼病。依照一个优选的实施方案,所述疾病选自下组:实体瘤、转移瘤、软组织肿瘤、具有眼新血管形成的疾病、具有异常血管发生的炎性疾病、移植入受试者后发生的疾病和具有纤维血管 (fibrovascular) 组织异常增殖的疾病。依照另一个优选的实施方案,所述癌症选自下组:乳腺癌 (包括转移性乳腺癌)、宫颈癌、结肠直肠癌 (包括转移性结肠直肠癌)、肺癌 (包括非小细胞肺癌)、非何杰金 (Hodgkin) 氏淋巴瘤 (NHL)、慢性淋巴细胞白血病、肾细胞癌、前列腺癌 (包括激素不应性前列腺癌 (hormone refractory prostate cancer))、肝癌、头颈癌、黑素瘤、卵巢癌、间皮瘤、软组织癌、胃肠道间质瘤 (gastrointestinal stromal tumor)、多形性成胶质细胞瘤和多发性骨髓瘤。依照另一个优选的实施方案,所述疾病选自下组:视网膜病、年龄诱发的黄斑变性 (例如湿性 AMD)、糖尿病黄斑水肿、发红;银屑病、炎性肾病、溶血性尿毒综合征 (haemolytic uremic syndrome)、糖尿病肾病 (例如增殖性糖尿病视网膜病)、关节炎 (例如银屑病关节炎、骨关节炎、类风湿性关节炎)、炎性肠病、慢性炎症、慢性视网膜剥离、慢性葡萄膜炎、慢性玻璃体炎、角膜移植片排斥、角膜新血管形成、角膜移植片新血管形成、克罗

恩 (Crohn) 氏病、近视、眼新血管病、佩吉特 (Paget) 氏病、类天疱疮、多动脉炎、激光放射状角膜切开术后、视网膜新血管形成、斯耶格伦 (Sogren) 氏综合征、溃疡性结肠炎、移植物排斥、肺部炎症、肾病综合征、水肿、与恶性肿瘤有关的腹水、中风、血管纤维瘤和新生血管性青光眼。在一个实施方案中,所述受试者进一步施用选自下组的治疗剂:抗肿瘤剂、化疗剂和细胞毒剂。

[0012] 依照本发明的一个优选实施方案,将要用 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂治疗的受试者在 VEGF 拮抗剂治疗后患有复发或变成对 VEGF 拮抗剂治疗耐受。依照另一个实施方案,将要用 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂治疗的受试者患有转移癌或先前已经用辅助疗法治疗过。在一个实施方案中,所述候选患者对于化疗剂(诸如伊立替康)是复发的、不应有的、或有抗性的。此类疾病的例子包括但不限于转移性结肠直肠癌、复发性转移性结肠直肠癌、转移性乳腺癌、复发性转移性乳腺癌、转移性 HER2+ 乳腺癌、乳腺癌、HER2+ 乳腺癌、转移性胰腺癌、结肠癌、非小细胞肺癌、直肠癌、非小细胞肺癌、转移性非小细胞肺癌、转移性卵巢癌、转移性肾细胞癌和肾细胞癌。

[0013] 依照一个实施方案,患有本文所述疾病的受试者在用 VEGF 拮抗剂治疗疾病后施用维持疗法,其中所述维持疗法是单独的或与 VEGF 拮抗剂顺次或同时施用的 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂。

[0014] 依照一个优选的实施方案,所述 VEGF 拮抗剂可选自下组:抗体、免疫粘附素、肽体(peptibody)、小分子和能在严格条件下与编码 VEGF 的核酸分子杂交的核酸(例如核酶、siRNA 和适体)。依照一个优选的实施方案,所述 VEGF 拮抗剂是抗体。依照另一个实施方案,所述抗体是单克隆抗体。依照一个优选的实施方案,所述抗 VEGF 抗体能够被 **Avastin®** 抗体竞争性抑制对人 VEGF 的结合。依照另一个实施方案,所述抗 VEGF 抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。依照一个具体的实施方案,所述抗 VEGF 抗体是 **Avastin®** 抗体。依照另一个实施方案,所述抗 VEGF 抗体选自下组:Fab、Fab'、F(ab)'₂、单链 Fv(scFv)、Fv 片段;双抗体和线性抗体。依照另一个实施方案,所述 VEGF 拮抗剂是能结合 VEGF 和 $\alpha 5 \beta 1$ 的双特异性抗体且是 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂。

[0015] 依照一个优选的实施方案,所述 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂可选自下组:抗体、免疫粘附素、肽体、小分子、和能在严格条件下与编码 $\alpha 5 \beta 1$ 的核酸分子杂交的核酸。依照一个优选的实施方案,所述 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂是抗体。依照另一个实施方案,所述抗体是单克隆抗体。依照又一个实施方案,所述单克隆抗体是嵌合抗体,诸如称为 M200 或 F200 的抗人 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体。依照一个实施方案,所述抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体包含 VH 序列 SEQ ID NO:1 和 VL 序列 SEQ ID NO:2。依照另一个实施方案,所述抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体包含序列 SEQ ID NO:3 和序列 SEQ ID NO:4。依照另一个实施方案,所述抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体包含序列 SEQ ID NO:4 和序列 SEQ ID NO:5。依照一个优选的实施方案,所述抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体能够被 7H5 抗体或 7H12 抗体竞争性抑制对人 $\alpha 5 \beta 1$ 的结合。依照一个优选的实施方案,所述抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。依照一个具体的实施方案,所述抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体是 7H5 抗体、7H12 抗体、或其嵌合抗体或人源化抗体。依照另一个实施方案,所述抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体选自下组:Fab、Fab'、F(ab)'₂、单链 Fv(scFv)、Fv 片段;双抗体和线性抗体。依照另一个实施方案,所述 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂是能结合 VEGF 和 $\alpha 5 \beta 1$ 的双特异性抗体且是 VEGF 拮抗剂。依照又一个实施方案,所述抗

$\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂具有改变的效应器功能。依照一个实施方案,所述抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体改变成降低或阻止抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 活性 (例如通过改变编码抗体 Fc 部分的核酸序列)。依照又一个实施方案,所述抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体已经改变成改进其在人体中的半衰期 (例如通过改变编码抗体 Fc 部分的核酸序列)。

[0016] 依照一个实施方案,所述 VEGF 拮抗剂或 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂偶联至细胞毒剂或化疗剂。依照另一个实施方案,所述细胞毒剂是放射性同位素或毒素。

[0017] 本发明提供了包含 VEGF 拮抗剂、 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂、和药学可接受载体的组合物。本发明还提供了包含关于检测已经用 VEGF 拮抗剂治疗过的受试者中的 $\alpha 5 \beta 1$ 的指令的制品。

[0018] 本发明还涉及 VEGFR 激动剂和 $\alpha 5 \beta 1$ 激动剂促进血管发生和血管通透性的用途,及包含 VEGFR 激动剂和 $\alpha 5 \beta 1$ 激动剂和药学可接受载体的组合物。所述 VEGFR 激动剂和 $\alpha 5 \beta 1$ 激动剂联合疗法可用于治疗将会受益于血管发生和血管通透性升高的多种疾病,包括例如伤口愈合,诸如在治疗慢性伤口、急性伤口和正常伤口中。

[0019] 附图简述

[0020] 图 1 显示了在用抗 VEGF 抗体 B20-4.1 处理 HT29 异种移植物肿瘤后表达 $\alpha 5 \beta 1$ 的基质细胞的募集增加。

[0021] 图 2 显示了在直接结合测定法中 7H5 和 7H12 抗体结合至 HUVEC 细胞。

[0022] 图 3 显示了根据 FACS 分析,7H5 和 7H12 抗体结合至 HUVEC,但不结合至 RAJI 细胞。

[0023] 图 4 显示了在存在纯化的 7H5 和 7H12 单克隆抗体时 HUVEC 粘附至纤连蛋白。

[0024] 图 5:(A) 条线图通过总细胞计数显示了 7H5 和 7H12 对 HUVEC 细胞增殖的影响;(B) 条线图通过另一测定法中的 Alamar 蓝染色显示了 7H5 和 7H12 对 HUVEC 细胞增殖的影响。

[0025] 图 6 是在用 7H5 处理后 0 小时和 30 小时 HUVEC 细胞迁移的照片,与阴性对照 (IgG) 进行比较。

[0026] 图 7 的条线图定量显示了在用 7H5 和 7H12 处理后的 HUVEC 细胞迁移

[0027] 图 8 的条线图显示了在用 7H5 和 7H12 处理后在凋亡测定法中表达活化的胱天蛋白酶-3 的 HUVEC 细胞的百分比。

[0028] 图 9 的条线图显示了在用 7H5 和 7H12 处理后的 HUVEC 胱天蛋白酶 3/7 活性。

[0029] 图 10 显示了 7H12 和 / 或贝伐单抗在家兔耳部伤口愈合模型中的活性。

[0030] 图 11 显示了在乳腺癌模型中用抗 VEGF 抗体 +/- 抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体治疗的小鼠的结果:(A) 图显示了经处理小鼠的组中值肿瘤体积;(B) Kaplan-Meier 曲线图显示了留在研究中的动物的百分比随时间的函数。动物在其肿瘤达到或超过 1500mm^3 时退出研究。

[0031] 图 12 显示了在结肠癌模型中用抗 VEGF 抗体 +/- 抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体治疗的小鼠的结果:(A) 图显示了经处理小鼠的组中值肿瘤体积;(B) Kaplan-Meier 曲线图显示了留在研究中的动物的百分比随时间的函数。动物在其肿瘤达到或超过 1500mm^3 时退出研究。

[0032] 图 13 显示了在结肠癌模型中用抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体或化疗剂治疗的小鼠的结果:(A) 图显示了经处理小鼠的组中值肿瘤体积;(B) Kaplan-Meier 曲线图显示了留在研究中的动物的百分比随时间的函数。动物在其肿瘤达到或超过 1500mm^3 时退出研究。

[0033] 图 14 显示了结合至 R9ab (一种家兔成纤维细胞细胞系) 上 $\alpha 5 \beta 1$ 的 ^{125}I -7H5 的

scatchard 曲线。

[0034] 图 15 显示了结合至 R9ab(一种家兔成纤维细胞细胞系)上 $\alpha 5 \beta 1$ 的 ^{125}I -7H12 的 scatchard 曲线。

[0035] 图 16 显示了多种抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的抗整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ IgG 表位定位 / 竞争性结合测定法的结果。

[0036] 发明详述

[0037] 不束缚于理论,我们建议基质细胞募集增加会将其它血管生长因子带至患病部位,从而补偿用 VEGF 拮抗剂疗法治疗的患者中 VEGF 活性的损失。用抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体靶向表达 $\alpha 5 \beta 1$ 的基质细胞可导致基质细胞的减少,从而减少潜在补偿性血管生长因子的生成。或者 / 另外,我们建议抑制内皮 - 胞外基质相互作用,特别是抑制 $\alpha 5 \beta 1$ 结合相互作用将通过抑制血管发生沿由于 VEGF 拮抗剂疗法引起的衰退血管留下的胞外基质轨迹返回而加强 VEGF 拮抗剂疗法。因此,与任何 VEGF 拮抗剂治疗同时或在任何 VEGF 拮抗剂治疗之后进行 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂治疗可抑制血管自该 VEGF 拮抗剂治疗恢复,从而新血管生长恢复。

[0038] “ $\alpha 5 \beta 1$ ”或“ $\alpha 5 \beta 1$ ”指包含两个不同蛋白质(即亚基 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$)的整联蛋白。 $\alpha 5 \beta 1$ 已显示出结合纤连蛋白、L1-CAM 和纤维蛋白原。 $\alpha 5 \beta 1$ 整联蛋白还称为 VLA-5(非常晚激活-5)、alpha5beta1、CD49e/CD29、纤连蛋白受体、FNR 和 GPIc-IIa。依照一个优选的实施方案,所述 $\alpha 5 \beta 1$ 是人 $\alpha 5 \beta 1$ 。

[0039] “ $\alpha 5$ ”也称为 CD49e、alpha5、整联蛋白 $\alpha 5$ 亚基、VLA-5 α 亚基、GPIc-IIa 的 IC 亚基和 FNR α 链,其具有四种通过可变剪接生成的同工型(isoform)(A-D)。它们在其胞质结构域内有所不同。 $\alpha 5$ 人同工型的氨基酸序列可分别见于例如 Genbank 编号: X07979、U33879、U33882 和 U33880。

[0040] “ $\beta 1$ ”也称为 CD29、beta1、血小板 GPIIa;VLA- β 链; β -1 整联蛋白链、CD29;FNRB;MDF2;VLAB;GPIIA;MSK12 和 VLA5B。人 $\beta 1$ 的氨基酸序列可见于例如 Genbank 编号 X06256。

[0041] 术语“VEGF”或“VEGF-A”在用于本文时指 165 个氨基酸的人血管内皮细胞生长因子及相关的 121 个、189 个和 206 个氨基酸的人血管内皮细胞生长因子,如 Leung 等 Science 246:1306(1989) 和 Houck 等 Mol. Endocrin, 5:1806(1991) 所述,及其天然存在等位基因形式和加工形式。术语“VEGF”还指来自非人物种诸如小鼠、大鼠或灵长类动物的 VEGF。有时,来自特定物种的 VEGF 表示如下,hVEGF 表示人 VEGF,mVEGF 表示鼠 VEGF,等等。术语“VEGF”还用于指包含 165 个氨基酸的人血管内皮细胞生长因子的氨基酸第 8-109 位或第 1-109 位的截短形式多肽。本申请中可能通过例如“VEGF(8-109)”、“VEGF(1-109)”或“VEGF₁₆₅”来鉴别任何此类形式 VEGF。“截短的”天然 VEGF 的氨基酸位置如天然 VEGF 序列中所示编号。例如,截短的天然 VEGF 中的第 17 位氨基酸(甲硫氨酸)也是天然 VEGF 中的第 17 位(甲硫氨酸)。截短的天然 VEGF 具有与天然 VEGF 相当的对 KDR 和 Flt-1 受体的结合亲和力。依照一个优选的实施方案,所述 VEGF 是人 VEGF。

[0042] “VEGF 拮抗剂”指能够中和、阻断、抑制、消除、降低或干扰 VEGF 活性(包括其与 VEGF 或一种或多种 VEGF 受体或编码它们的核酸结合)的分子。优选的是,所述 VEGF 拮抗剂能结合 VEGF 或 VEGF 受体。VEGF 拮抗剂包括抗 VEGF 抗体及其抗原结合片段、能结合 VEGF 和 VEGF 受体并阻断配体 - 受体相互作用的多肽(例如免疫粘附素、肽体)、抗 VEGF 受体抗

体和 VEGF 受体拮抗剂诸如 VEGFR 酪氨酸激酶的小分子抑制剂、能结合 VEGF 的适体和能在严格条件下与编码 VEGF 或 VEGF 受体杂交的核酸（例如 RNAi）。依照一个优选的实施方案，所述 VEGF 拮抗剂能结合 VEGF 并抑制 VEGF 诱导的内皮细胞增殖（在体外）。依照一个优选的实施方案，所述 VEGF 拮抗剂以大于非 VEGF 或非 VEGF 受体的亲和力结合 VEGF 或 VEGF 受体。依照一个优选的实施方案，所述 VEGF 拮抗剂以介于 1 μ M 和 1pM 之间的 Kd 结合 VEGF 或 VEGF 受体。依照另一个优选的实施方案，所述 VEGF 拮抗剂以介于 500nM 和 1pM 之间的 Kd 结合 VEGF 或 VEGF 受体。

[0043] 依照一个优选的实施方案，所述 VEGF 拮抗剂选自下组：多肽诸如抗体、肽体、免疫粘附素、小分子或适体。在一个优选的实施方案中，所述抗体是抗 VEGF 抗体（诸如 **AVASTIN®** 抗体）或抗 VEGF 受体抗体（诸如抗 VEGFR2 或抗 VEGFR3 抗体）。VEGF 拮抗剂的其它例子包括：VEGF-Trap、Mucagen、PTK787、SU11248、AG-013736、Bay 439006 (sorafenib)、ZD-6474、CP632、CP-547632、AZD-2171、CDP-171、SU-14813、CHIR-258、AEE-788、SB786034、BAY579352、CDP-791、EG-3306、GW-786034、RWJ-417975/CT6758 和 KRN-633。

[0044] “抗 VEGF 抗体”指以足够亲和力和特异性结合 VEGF 的抗体。优选的是，本发明的抗 VEGF 抗体可在靶向和干预其中牵涉 VEGF 活性的疾病或疾患中用作治疗剂。抗 VEGF 抗体通常不会结合其它 VEGF 同系物，诸如 VEGF-B 或 VEGF-C，也不会结合其它生长因子，诸如 PlGF、PDGF 或 bFGF。一种优选的抗 VEGF 抗体是与杂交瘤 ATCC HB 10709 所生成的单克隆抗 VEGF 抗体 A4.6.1 结合相同表位的单克隆抗体。更优选的是，抗 VEGF 抗体是依照 Presta 等 (1997) Cancer Res. 57:4593-4599 生成的重组人源化抗 VEGF 单克隆抗体，包括但不限于称为贝伐单抗 (bevacizumab ;BV ; **Avastin®**) 的抗体。依照另一个实施方案，可以使用的抗 VEGF 抗体包括但不限于 W0 2005/012359 中披露的抗体。依照一个实施方案，所述抗 VEGF 抗体包含 W0 2005/012359 的图 24、25、26、27 和 29 中披露的任一抗体（例如 G6、G6-23、G6-31、G6-23.1、G6-23.2、B20、B20-4 和 B20.4.1）的重链可变区和轻链可变区。在另一个优选的实施方案中，称为 ranibizumab 的抗 VEGF 抗体是为了眼病诸如糖尿病神经病变和 AMD 而施用的 VEGF 拮抗剂。

[0045] 抗 VEGF 抗体“贝伐单抗”(bevacizumab, BV), 也称为“rhuMAb VEGF”或“**Avastin®**”, 是依照 Presta et al. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599 生成的重组人源化抗 VEGF 单克隆抗体。它包含突变的人 IgG1 框架区和来自能阻断人 VEGF 结合其受体的鼠抗 hVEGF 单克隆抗体 A4.6.1 的抗原结合互补决定区。贝伐单抗大约 93% 的氨基酸序列（包括大部分框架区）衍生自人 IgG1, 而大约 7% 的序列衍生自鼠抗体 A4.6.1。贝伐单抗具有约 149,000 道尔顿的分子量，而且是糖基化的。其它抗 VEGF 抗体包括美国专利 No. 6,884,879 和 W02005/044853 中记载的抗体。

[0046] 抗 VEGF 抗体 Ranibizumab 或 **LUCENTIS®** 抗体或 rhuFab V2 是人源化的、亲和力成熟的抗人 VEGF Fab 片段。Ranibizumab 是通过标准重组技术方法在大肠杆菌表达载体和细菌发酵中生成的。Ranibizumab 是未糖基化的且分子量为约 48,000 道尔顿。参见 W098/45331 和 US20030190317。

[0047] “ $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂”指能抑制 $\alpha 5 \beta 1$ 的生物学活性的任何分子。依照一个优选的实施方案，所述拮抗剂分子能特异性结合 $\alpha 5 \beta 1$ 。依照一个优选的实施方案，所述拮抗剂分子

能结合 $\alpha 5$ 。依照一个优选的实施方案, $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂以相对于非 $\alpha 5 \beta 1$ 整联蛋白更大的亲和力优先结合 $\alpha 5 \beta 1$ 。依照一个优选的实施方案, 所述拮抗剂选自下组: 能抑制 $\alpha 5 \beta 1$ 结合其配体(特别是纤连蛋白)的多肽诸如抗体、肽体或免疫粘附素、小分子或适体, 或者能在严格条件下与编码 $\alpha 5 \beta 1$ 的核酸分子杂交的核酸(例如能干扰 $\alpha 5$ 表达的 RNAi)。 $\alpha 5 \beta 1$ 的生物学活性可以是选自下组的任一效应、效应组合或所有效应: (1) 结合纤连蛋白; (2) 增强细胞在纤连蛋白上的迁移; (3) 提高包含 $\alpha 5 \beta 1$ 的细胞在存在纤连蛋白时的存活; (4) 提高包含 $\alpha 5 \beta 1$ 的细胞在存在纤连蛋白时的增殖; 和 (5) 提高包含 $\alpha 5 \beta 1$ 的细胞在存在纤连蛋白时的管形成。

[0048] 抗 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗性抗体的例子包括 M200 和 F200(WO 2004/089988A2)、本文所述 7H5 抗体和 7H12 抗体、及其嵌合抗体、完全人抗体和人源化抗体。例如, M200 和 F200 抗体可衍生自小鼠抗人 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体 IIA1(Pharmingen, San Diego, Ca) 的可变重链和可变轻链。 $\alpha 5 \beta 1$ 小分子抑制剂的例子包括 Ac-PHSCN-NH₂(WO-9822617A1) 和 (S)-2-[(2,4,6-三甲苯基)磺酰基]氨基-3-[7-苄氧羰基-8-(2-吡啶基氨基甲基)-1-氧杂-2,7-二氮代螺-(4,4)-酮-2-烯-3-基]羰基氨基]丙酸。依照一个优选的实施方案, 所述 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂结合 $\alpha 5 \beta 1$ 且不结合 $\alpha V \beta 3$ 或 $\alpha V \beta 5$ 或 $\alpha V \beta 1$ 。依照一个优选的实施方案, 所述 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂以介于 1 μ M 和 1pM 之间的 K_d 结合 $\alpha 5 \beta 1$ 。依照另一个优选的实施方案, 所述 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂以介于 500nM 和 1pM 之间的 K_d 结合 $\alpha 5$ 。依照一个优选的实施方案, 所述 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体是能在竞争性结合测定法中与 7H5 抗体或 7H12 抗体竞争 $\alpha 5 \beta 1$ 结合的抗体。依照另一个优选的实施方案, 所述抗体是能被由下述杂交瘤生成的抗体竞争性抑制 $\alpha 5 \beta 1$ 结合的抗体: 2006 年 3 月 7 日作为 A5/ $\beta 1$ 7H5. 4. 2. 8(ATCC No. PTA-7421) 保藏的杂交瘤或作为 A5/ $\beta 1$ 7H12. 5. 1. 4(ATCC No. PTA-7420) 保藏的杂交瘤。

[0049] “VEGFR 激动剂”指能活化 VEGF 受体或提高其表达的分子。VEGFR 激动剂包括但不限于例如 VEGFR 的配体激动剂、VEGF 变体、抗体和活性片段。

[0050] “ $\alpha 5 \beta 1$ 激动剂”指能活化 $\alpha 5 \beta 1$ 或提高其表达的分子。 $\alpha 5 \beta 1$ 激动剂包括但不限于例如 $\alpha 5 \beta 1$ 的配体激动剂。

[0051] 以结合至靶物上交叠的或相似的区域为特征的分子(诸如抗体)可以通过竞争性抑制/结合测定法来鉴定。

[0052] 在一个实施方案中, 在竞争性抑制测定法中使用表达 $\alpha 5 \beta 1$ 的 HUVEC 或其它细胞, 而且使用 FACS 来评估两种抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体相对于彼此的结合位置。例如, 可以将 HUVEC 细胞在锥形管中清洗, 并以 1000rpm 离心 5 分钟。通常将沉淀物清洗两次。然后, 可以将细胞重悬, 计数, 并放置在冰上直至使用。可以向孔中添加 100 μ l 第一抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体(例如从 1 μ g/ml 浓度或更低浓度开始)。接着, 可以向每个孔中添加 100 μ l 细胞(例如 20x10⁵ 个细胞), 并在冰上温育 30 分钟。接着, 可以向每个孔中添加 100 μ l 生物素化抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体(5 μ g/ml 储液), 并在冰上温育 30 分钟。然后将细胞清洗, 并以 1000rpm 离心 5 分钟。吸去上清液。向孔中添加第二抗体 R-藻红蛋白偶联链霉亲和素(Jackson 016-110-084)(100 μ l, 1:1000)。接着, 可以将板包裹在金属箔中, 并在冰上温育 30 分钟。温育后, 可以将沉淀物清洗, 并以 1000rpm 离心 5 分钟。可以将沉淀物重悬, 并转移至微量滴定管, 供 FACS 分析。

[0053] “血管发生因子”或“血管发生剂”指刺激血管发育, 例如促进血管发生

(angiogenesis)、内皮细胞生长、血管稳定性和 / 或血管生成 (vasculogenesis) 等的生长因子。例如,血管发生因子包括但不限于例如 VEGF 和 VEGF 家族的成员、PlGF、PDGF 家族、成纤维细胞生长因子家族 (FGF)、TIE 配体 (血管生成素)、ephrin、Del-1、酸性 (aFGF) 和碱性 (bFGF) 成纤维细胞生长因子、卵泡抑素 (Follistatin)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、肝细胞生长因子 (HGF) / 散射因子 (SF)、白介素 -8 (IL-8)、Leptin、Midkine、胎盘生长因子、血小板衍生内皮细胞生长因子 (PD-ECGF)、血小板衍生生长因子尤其是 PDGF-BB 或 PDGFR- β 、Pleiotrophin (PTN)、Progranulin、Proliferin、转化生长因子 - α (TGF- α)、转化生长因子 - β (TGF- β)、肿瘤坏死因子 - α (TNF- α)、血管内皮生长因子 (VEGF) / 血管通透性因子 (VPF) 等。它还包括加速伤口愈合的因子,诸如生长激素、胰岛素样生长因子 -I (IGF-I)、VIGF、表皮生长因子 (EGF)、CTGF 及其家族的成员、及 TGF- α 和 TGF- β 。参见例如 Klagsbrun and D' Amore, *Annu. Rev. Physiol.* 53 :217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene* 22 : 3172-3179 (2003); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5 (12) :1359-1364 (1999); Tonini 等, *Oncogene* 22 :6549-6556 (2003) (例如列举已知血管发生因子的表 1); Sato, *Int. J. Clin. Oncol.* 8 :200-206 (2003)。

[0054] 在一个优选的实施方式中,依照本发明的抗 VEGF 抗体的“Kd”或“Kd 值”是通过如下测定法所述使用 Fab 型式的抗体和 VEGF 分子进行的放射性标记 VEGF 结合测定法 (RIA) 来测量的:通过在存在未标记 VEGF 的滴定系列的条件下,用最小浓度的 (^{125}I) 标记 VEGF (109) 平衡 Fab,然后用抗 Fab 抗体包被的平板捕捉所结合的 VEGF 来测量 Fab 对 VEGF 的溶液结合亲和力 (Chen, et al., (1999) *J Mol Biol* 293 :865-881)。为了确定测定条件,用 50mM 碳酸钠 (pH 9.6) 中的 5 $\mu\text{g/ml}$ 捕捉用抗 Fab 抗体 (Cappel Labs) 包被微量滴定板 (Dynerx) 过夜,随后用 PBS 中的 2% (w/v) 牛血清清蛋白于室温 (约 23 $^{\circ}\text{C}$) 封闭 2-5 小时。在非吸附平板 (Nunc#269620) 中,将 100pM 或 26pM [^{125}I]-VEGF (109) 与连续稀释的感兴趣 Fab,例如 Fab-12 (Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57 :4593-4599) 混合。然后将感兴趣 Fab 保温过夜;不过,保温可持续 65 个小时以保证达到平衡。此后,将混合物转移至捕捉板以进行室温保温 1 小时。然后除去溶液,并用含 0.1% Tween-20 的 PBS 洗板 8 次。平板干燥后,加入 150 μl / 孔闪烁液 (MicroScint-20; Packard),然后在 Topcount 伽马计数器 (Packard) 上对平板计数 10 分钟。选择各 Fab 给出小于或等于最大结合之 20% 的浓度用于竞争性结合测定法。依照另一实施方式, Kd 或 Kd 值是通过表面等离子共振测定法使用 BIAcoreTM-2000 或 BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 使用固定化 hVEGF (8-109) CM5 芯片在约 10 个响应单位 (RU) 测量的。简而言之,依照供应商的说明书用盐酸 N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺 (EDC) 和 N-羧基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片 (CM5, BIAcore Inc.)。用 10mM 乙酸钠 pH 4.8 将人 VEGF 稀释至 5 $\mu\text{g/ml}$ (约 0.2 μM),然后以 5 μl / 分钟的流速注入至获得约 10 个响应单位 (RU) 的偶联蛋白质。注入人 VEGF 后,注入 1M 乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量,于 25 $^{\circ}\text{C}$ 以约 25 μl / 分钟的流速注入在含 0.05% Tween-20 的 PBS (PBST) 中两倍连续稀释的 Fab (0.78nM 至 500nM)。使用简单一对一朗格缪尔 (Langmuir) 结合模型 (BIAcore Evaluation Software version 3.2) 通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。平衡解离常数 (Kd) 以比率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 计算。参见例如 Chen, Y., et al., *J Mol Biol* 293 :865-881 (1999)。如果根据上文表面等离子共振测定法,结合速率超过

$10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, 那么结合速率可使用荧光淬灭技术来测定, 即根据分光计诸如配备了断流装置的分光光度计 (astop-flow equipped spectrophotometer) (Aviv Instruments) 或 8000 系列 SLM-Aminco 分光光度计 (ThermoSpectronic) 中用搅拌比色杯的测量, 在存在浓度渐增的人 VEGF 短型 (8-109) 或小鼠 VEGF 的条件下, 测量 PBS, pH 7.2 中的 20nM 抗 VEGF 抗体 (Fab 形式) 于 25°C 的荧光发射强度 (激发 = 295nm; 发射 = 340nm, 16nm 带通) 的升高或降低。可以使用 $\alpha 5 \beta 1$ 作为靶物实施相似的结合测定法来测定抗 $\alpha 5 \beta 1$ Fab 或抗体的 Kd。

[0055] 在用于本文时, 待治疗的受试者指哺乳动物 (例如人、非人灵长类、大鼠、小鼠、牛、马、猪、绵羊、山羊、犬、猫等)。受试者可以是临床患者、临床试验志愿者、实验动物等。受试者可以是怀疑患有或有风险患上癌症、免疫病、或具有异常血管发生的任何其它疾病, 诊断有癌症、免疫病、或具有异常血管发生的任何其它疾病。癌症、免疫病或展现出异常血管发生的任何其它疾病的许多诊断及那些疾病的临床描述是本领域已知的。依照一个优选的实施方案, 有待依照本发明治疗的受试者指人。

[0056] 术语异常血管发生发生于疾病状态中的或引起疾病状态的新血管生长过度或不当 (例如从医学观点看不良的血管发生位置、时间或启动) 时。过度的、不当的或失控的血管发生发生于有促成疾病状态恶化或引起疾病状态的新血管生长时, 诸如癌症尤其是血管化实体瘤和转移瘤 (包括结肠癌、肺癌 (尤其是小细胞肺癌)、或前列腺癌), 由眼新血管形成引起的疾病尤其是糖尿病性失明、视网膜病变、原发性糖尿病性视网膜病变 (primarily diabetic retinopathy) 或年龄诱发的黄斑变性 (AMD), 脉络膜新血管形成 (CNV), 糖尿病黄斑水肿, 病理性近视, von Hippel-Lindau 病, 眼组织胞浆菌病, 视网膜中央静脉阻塞 (CRVO), 角膜新血管形成, 视网膜新血管形成和发红; 银屑病、银屑病关节炎、成血管细胞瘤诸如血管瘤; 炎性肾病, 诸如肾小球肾炎, 尤其是膜增生性肾小球肾炎、溶血性尿毒综合征 (haemolytic uremic syndrome)、糖尿病肾病或高血压肾硬化; 各种炎性疾病, 诸如关节炎, 尤其是类风湿性关节炎、炎性肠病、银屑病、结节病、动脉硬化和移植后发生的疾病、子宫内膜异位症或慢性哮喘, 及超过 70 种其它疾患。新血管可供应患病组织, 破坏正常组织, 而且, 在癌症的情况中, 新血管可容许肿瘤细胞逃入循环并停留在其它器官中 (肿瘤转移)。本发明涵盖治疗那些有风险发生上述疾病的患者。

[0057] 作为接受本发明抗体或多肽的候选者的其他患者具有或者有风险发生纤维血管组织异常增殖、酒渣鼻 (红斑痤疮)、获得性免疫缺陷综合征、动脉阻塞、特应性角膜炎、细菌性溃疡、贝切特氏病 (Behets disease)、血液传播的肿瘤 (blood borne tumor)、颈动脉阻塞性疾病、脉络膜新血管形成、慢性炎症、慢性视网膜剥离、慢性葡萄膜炎、慢性玻璃体炎、接触镜佩戴过度、角膜移植片排斥、角膜新血管形成、角膜移植片新血管形成、克罗恩氏病 (Crohn's disease)、伊尔斯病 (Eales disease)、流行性角膜结膜炎、真菌性溃疡、单纯疱疹感染、带状疱疹感染、高粘滞综合征、卡波西氏肉瘤 (Kaposi's sarcoma)、白血病、脂质变性、莱姆氏病 (Lyme's disease)、边缘角质层分离 (marginal keratolysis)、莫伦溃疡 (Mooren ulcer)、除麻风以外的分枝杆菌感染、近视、眼新血管疾病、视窝 (optic pits)、奥-韦二氏综合征 (Osler-Weber syndrome) (奥斯勒-韦伯-朗迪 (Osler-Weber-Rendu) 病)、骨关节炎、佩吉特氏病 (Pagets disease)、扁平部睫状体炎 (pars planitis)、类天疱疮、phlyctenulosis、多动脉炎、激光后并发症 (post-laser complication)、原生动物感染、弹性假黄色瘤、翼状胬肉 (pterygium)、干燥性角膜炎、放射状角膜切开术、视网膜新

血管形成、早产儿视网膜病、晶状体后纤维组织增生、类肉瘤 / 结节病 (sarcoid)、巩膜炎、镰状细胞贫血、斯耶格伦氏综合征 (Sogrens syndrome)、实体瘤、斯塔加特病 (Stargarts disease)、约 - 斯病 (Steven' s Johnson disease)、上缘角膜炎 (superior limbic keratitis)、梅毒、全身性狼疮、特里昂氏边缘变性 (Terrien' smarginal degeneraion)、弓形虫病、外伤、尤因肉瘤 (Ewing sarcoma) 的肿瘤、成神经细胞瘤的肿瘤、骨肉瘤的肿瘤、视网膜母细胞瘤的肿瘤、横纹肌肉瘤的肿瘤、溃疡性结肠炎、静脉阻塞、维生素 A 缺乏和韦格纳结节病 (Wegenerssarcoidosis)、与糖尿病有关的不良血管发生、寄生虫病、异常伤口愈合、外伤、损伤或手术后肥大、毛发生长抑制、排卵和黄体形成抑制、子宫中胚胎发育抑制和植入抑制。

[0058] 抗血管发生疗法可用于以下各项的一般治疗：移植物排斥、肺部炎症、肾病综合征、先兆子痫、心包积液（诸如与心包炎有关的）和胸腔积液、特征为不良血管通透性的疾病和病症，例如与脑瘤有关的水肿、与恶性肿瘤有关的腹水、梅格斯氏 (Meigs) 综合征、肺部炎症、肾病综合征、心包积液、胸腔积液、与心血管疾病有关的通透性，诸如心肌梗死和中风后的疾患，诸如此类。

[0059] 依照本发明的其它血管发生依赖性疾病包括血管纤维瘤（倾向于出血的异常血管）、新生血管性青光眼（眼中的血管生长）、动静脉畸形（动脉与静脉之间的异常联络）、不连接的骨折（不会愈合的骨折）、动脉粥样硬化斑块（动脉的硬化）、脓性肉芽肿（由血管构成的常见皮肤损伤）、硬皮病（结缔组织疾病的一种形式）、血管瘤（由血管构成的肿瘤）、沙眼（第三世界失明的第一位原因）、血友病性关节、血管粘连和肥厚性瘢痕（异常瘢痕形成）。

[0060] “治疗”指治疗性处理和预防性或防范性措施二者。需要治疗的受试者包括早就患有病症的受试者以及要预防病症的受试者。

[0061] 术语“复发”指癌症或疾病在疾病消失的临床评估后返回。远距转移或局部复发的诊断可以视为复发。

[0062] 术语“耐受性”、“耐药性”、“抗性”或“不应性”指癌症或疾病对治疗没有响应。

[0063] 术语“辅助疗法”指在主要疗法（通常是手术）之后给予的治疗。癌症或疾病的辅助疗法可以包括免疫疗法、化疗、放疗或激素疗法。

[0064] 术语“维持疗法”指为了帮助维持先前的治疗效果而给予的有计划的复治。常常为了帮助将癌症保持在消退或延长对特定疗法的响应（不管疾病进展）而给予维持疗法。

[0065] 术语“侵入性癌”指超过其起始的组织层而传播进入正常周围组织的癌。侵入性癌可以是或不是转移性的。

[0066] 术语“非侵入性癌”指非常早期的癌或未传播超过起源组织的癌。

[0067] 术语“无进展存活”在肿瘤学中指治疗期间和之后癌症没有生长的时间长度。无进展存活包括患者经历完全响应或部分响应的时间量，以及患者经历稳定病情的时间量。

[0068] 术语“进行性疾病”在肿瘤学中可以指自治疗开始超过 20% 的肿瘤生长 - 或是由于质量的增加或是由于肿瘤的扩散。

[0069] “病症”指任何会受益于抗体治疗的疾患。例如，患有或需要预防异常血管发生（过度的、不当的或失控的血管发生）或血管通透性的哺乳动物。这包括慢性和急性病症或疾病，包括那些使哺乳动物倾向于所讨论病症的病理状况。本文中待治疗的病症的非限制性

例子包括恶性和良性肿瘤；非白血病和淋巴样恶性肿瘤；神经元、神经胶质、星细胞、下丘脑和其它腺体、巨噬细胞、上皮、基质和囊胚腔病症；及炎性、血管发生性和免疫学病症。

[0070] 术语“癌症”和“癌性”指或描述哺乳动物中特征典型的为细胞生长不受调节的生理疾患。癌症的例子包括但不限于癌（癌瘤）、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、和白血病。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌（liver cancer, hepatic carcinoma）、膀胱癌、肝瘤（hepatoma）、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾癌（kidney cancer, renal cancer）、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、头颈癌、直肠癌、结肠直肠癌、肺癌（包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌和肺的鳞癌）、鳞状细胞癌（例如上皮鳞状细胞癌）、前列腺癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌（gastric or stomach cancer）（包括胃肠癌）、胰腺癌、成胶质细胞瘤、成视网膜细胞瘤、星形细胞瘤、泡膜细胞瘤、男性细胞瘤、肝瘤（hepatoma）、血液学恶性肿瘤（包括非何杰金（Hodgkin）氏淋巴瘤（NHL）、多发性骨髓瘤和急性血液学恶性肿瘤）、子宫内膜癌或子宫癌、子宫内膜异位症、纤维肉瘤、绒毛膜癌、唾液腺癌、外阴癌、甲状腺癌、食管癌、肝癌（hepatic carcinoma）、肛门癌、阴茎癌、鼻咽癌、喉癌、卡波西（Kaposi）氏肉瘤、黑素瘤、皮肤癌、许旺氏细胞瘤、少突神经胶质瘤、成神经细胞瘤、横纹肌肉瘤、骨源性肉瘤、平滑肌肉瘤、尿道癌、甲状腺癌、维尔姆斯（Wilm）氏肿瘤、以及B细胞淋巴瘤（包括低级/滤泡性非何杰金氏淋巴瘤（NHL）、小淋巴细胞性（SL）NHL、中级/滤泡性NHL、中级弥漫性NHL、高级成免疫细胞性NHL、高级成淋巴细胞性NHL、高级小无核裂细胞性NHL、贮积病（bulky disease）NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤、和瓦尔登斯特伦氏（Waldenstrom）巨球蛋白血症）、慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、急性成淋巴细胞性白血病（ALL）、毛细胞性白血病、慢性成髓细胞性白血病、和移植后淋巴增殖性病症（PTLD）、以及梅格斯氏（Meigs）综合征、和癥瘕病（phakomatoses）有关的异常血管增殖。

[0071] “肿瘤”在用于本文时指所有赘生性细胞生长和增殖，无论是恶性的或者是良性的，及所有癌前的和癌前的细胞和组织。

[0072] 术语“抗肿瘤组合物”或“抗肿瘤剂”指可用于治疗癌症的组合物，其包含至少一种活性治疗剂，例如“抗癌剂”。治疗剂（抗癌剂）的例子包括但不限于例如化疗剂、生长抑制剂、细胞毒剂、放射疗法中所使用的药剂、抗血管发生剂、凋亡剂、抗微管蛋白剂、和其它用于治疗癌症的药剂诸如抗HER-2抗体、抗CD20抗体、表皮生长因子受体（EGFR）拮抗剂（例如酪氨酸激酶抑制剂）、HER1/EGFR抑制剂（例如erlotinib（Tarceva™）、血小板衍生长因子抑制剂（例如Gleevec™（Imatinib Mesylate））、COX-2抑制剂（例如塞来考昔（celecoxib））、干扰素、细胞因子、能与ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR-β、BAFF、BR3、APRIL、BCMA或VEGF受体中的一种或多种靶物结合的拮抗剂（例如中和性抗体）、TRAIL/Apo2、及其它生物活性和有机化学剂等。本发明还涵盖它们的组合。

[0073] “生长抑制剂”在用于本文时指在体外和/或在体内抑制细胞生长的化合物或组合物。如此，生长抑制剂可以是显著降低处于S期的细胞百分比的药剂。生长抑制剂的例子包括阻断细胞周期行进（处于S期以外的位置）的药剂，诸如诱导G1停滞和M期停滞的药剂。经典的M期阻断剂包括长春药类（vincas）（长春新碱（vincristine）和长春碱（vinblastine））、**TAXOL®**、和拓扑异构酶II抑制剂诸如多柔比星（doxorubicin）、表柔比星（epirubicin）、柔红霉素（daunorubicin）、依托泊苷（etoposide）和博来

霉素 (bleomycin)。那些阻滞 G1 的药剂也溢出进入 S 期停滞, 例如 DNA 烷化剂类诸如他莫昔芬 (tamoxifen)、泼尼松 (prednisone)、达卡巴嗪 (dacarbazine)、双氯乙基甲胺 (mechlorethamine)、顺铂 (cisplatin)、甲氨喋呤 (methotrexate)、5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil) 和 ara-C。更多信息可参见 The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel 编, 第 1 章, 题为“Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs”, Murakami et al., WB Saunders, Philadelphia(1995), 尤其是第 13 页。

[0074] 术语“细胞毒剂”在用于本文时指抑制或阻止细胞功能和 / 或引起细胞破坏的物质。该术语意图包括放射性同位素 (例如 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 和 Re^{186})、化疗剂、和毒素诸如细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素或其片段。

[0075] “化疗剂”指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的例子包括可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的例子包括烷化剂类 (alkylating agents), 诸如塞替派 (thiotepa) 和 **CYTOXAN®** 环磷酰胺 (cyclophosphamide); 磺酸烷基酯类 (alkyl sulfonates), 诸如白消安 (busulfan)、英丙舒凡 (improsulfan) 和哌泊舒凡 (piposulfan); 氮丙啶类 (aziridines), 诸如苯佐替派 (benzodepa)、卡波醌 (carboquone)、美妥替派 (meturedopa) 和乌瑞替派 (uredepa); 乙撑亚胺类 (ethylenimines) 和甲基蜜胺类 (methylamelamines), 包括六甲蜜胺 (altretamine)、三乙撑蜜胺 (triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺 (triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺 (triethylenethiophosphoramidate) 和三羟甲蜜胺 (trimethylolomelamine); 番荔枝内酯类 (acetogenins) (尤其是布拉他辛 (bullatacin) 和布拉他辛酮 (bullatacinone)); 喜树碱 (camptothecin) (包括合成类似物托泊替康 (topotecan)); 苔藓抑素 (bryostatins); callystatin; CC-1065 (包括其阿多来新 (adozelesin)、卡折来新 (carzelesin) 和比折来新 (bizelesin) 合成类似物); 隐藻素类 (cryptophycins) (特别是隐藻素 1 和隐藻素 8); 多拉司他汀 (dolastatin); duocarmycin (包括合成类似物, KW-2189 和 CB1-TM1); 艾榴塞洛素 (eleutherobin); pancratistatin; sarcodictyin; 海绵抑素 (spongistatin); 氮芥类 (nitrogen mustards), 诸如苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、萘氮芥 (chlornaphazine)、胆磷酰胺 (cholophosphamide)、雌莫司汀 (estramustine)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、双氯乙基甲胺 (mechlorethamine)、盐酸氧氮芥 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑 (melphalan)、新氮芥 (novembichin)、苯芥胆甾醇 (phenesterine)、泼尼莫司汀 (prednimustine)、曲磷胺 (trofosfamide)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard); 亚硝脲类 (nitrosoureas), 诸如卡莫司汀 (carmustine)、氯脲菌素 (chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine) 和雷莫司汀 (ranimustine); 抗生素类, 诸如烯二炔类抗生素 (enediynes) (例如加利车霉素 (calicheamicin), 尤其是加利车霉素 γ II 和加利车霉素 ω II (参见例如 Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl. 33 :183-186 (1994))); 蒽环类抗生素 (dynemicin), 包括 dynemicin A; 二膦酸盐类 (bisphosphonates), 诸如氯膦酸盐 (clodronate); 埃斯波霉素 (esperamicin); 以及新制癌素 (neocarzinostatin) 发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素 (aclacinomycin)、放线菌素 (actinomycin)、氨茴霉素 (anthramycin)、偶氮丝氨酸 (azaserine)、博来霉素 (bleomycin)、放线菌素 C (cactinomycin)、carabycin、

洋红霉素 (carminomycin)、嗜癌霉素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycin)、放线菌素 D (dactinomycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、**ADRIAMYCIN®**多来比星 (doxorubicin) (包括吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、麻西罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素类 (mitomycins) 诸如丝裂霉素 C、霉酚酸 (mycophenolic acid)、诺拉霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycin)、培洛霉素 (peplomycin)、potfiromycin、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑菌素 (streptonigrin)、链佐星 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin); 抗代谢物类, 诸如甲氨蝶呤 (methotrexate) 和 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸 (denopterin)、甲氨蝶呤 (methotrexate)、蝶罗呤 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate); 嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨 (fludarabine)、6-巯基嘌呤 (mercaptopurine)、硫咪嘌呤 (thiamiprine)、硫鸟嘌呤 (thioguanine); 嘧啶类似物, 诸如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6-氮尿苷 (azauridine)、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、去氧氟尿苷 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、氟尿苷 (floxuridine); 雄激素类, 诸如卡鲁睾酮 (calusterone)、丙酸屈他雄酮 (dromostanolone propionate)、表硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾内酯 (testolactone); 抗肾上腺类, 诸如氨鲁米特 (aminoglutethimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充剂, 诸如亚叶酸 (folinic acid); 醋葡醛内酯 (aceglatone); 醛磷酸胺糖苷 (aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸 (aminolevulinic acid); 恩尿嘧啶 (cniluracil); 安吡啶 (amsacrine); bestrabucil; 比生群 (bisantrene); 依达曲沙 (cdatraxate); 地磷酰胺 (defosfamide); 地美可辛 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); elfornithine; 依利醋铵 (elliptinium acetate); 埃坡霉素 (epothilone); 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓; 羟脲 (hydroxyurea); 香菇多糖 (lentinan); 氯尼达明 (lonidamine); 美登木素生物碱类 (maytansinoids), 诸如美登素 (maytansine) 和安丝菌素 (ansamitocin); 米托胍脲 (mitoguazone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 莫哌达醇 (mopidamol); 二胺硝吡啶 (nitracrine); 喷司他丁 (pentostatin); 蛋氨酸芥 (phenamet); 吡柔比星 (pirarubicin); 洛索蒽醌 (losoxantrone); 鬼臼酸 (podophyllinic acid); 2-乙基酰肼 (ethylhydrazide); 丙卡巴肼 (procarbazine); **PSK®** 多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 雷佐生 (razoxane); 根霉素 (rhizoxin); 西佐喃 (sizofiran); 螺旋锗 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌 (triaziquone); 2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢菌素类 (trichothecenes) (尤其是 T-2 毒素、疣孢菌素 (verrucarin) A、杆孢菌素 (roridin) A 和蛇行菌素 (anguidin)); 乌拉坦 (urethan); 长春地辛 (vindesine); 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露莫司汀 (mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 哌泊溴烷 (pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷 (arabinoside) (“Ara-C”); 环磷酰胺 (cyclophosphamide); 塞替派 (thiotepa); 类紫杉醇类 (taxoids), 例如 **TAXOL®** 帕利他塞 (paclitaxel) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.)、**ABRAXANE™** 帕利他塞的不含克列莫佛 (Cremophor)、清蛋

白改造纳米颗粒剂型 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) 和 **TAXOTERE®** 多西他塞 (doxorubicin) (**Rhône-Poulenc** Rorer, Antony, France) ; 苯丁酸氮芥 (chlorambucil) ; **GEMZAR®** 吉西他滨 (gemcitabine) ; 6- 硫鸟嘌呤 (由 ioguanine) ; 巯基嘌呤 (mercaptopurine) ; 甲氨蝶呤 (methotrexate) ; 铂类似物, 诸如顺铂 (cisplatin) 和卡铂 (carboplatin) ; 长春碱 (vinblastine) ; 铂 (platinum) ; 依托泊苷 (etoposide) (VP-16) ; 异环磷酰胺 (ifosfamide) ; 米托蒽醌 (mitoxantrone) ; 长春新碱 (vincristine) ; **NAVELBINE®** 长春瑞滨 (vinorelbine) ; 能灭瘤 (novantrone) ; 替尼泊苷 (teniposide) ; 依达曲沙 (edatrexate) ; 道诺霉素 (daunomycin) ; 氨基蝶呤 (aminopterin) ; 希罗达 (xeloda) ; 伊本膦酸盐 (ibandronate) ; 伊立替康 (irinotecan) (Camptosar, CPT-11) (包括伊立替康及 5-FU 和亚叶酸的治疗方案) ; 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000 ; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO) ; 类视黄酸类 (retinoids), 诸如视黄酸 (retinoic acid) ; 卡培他滨 (capecitabine) ; 考布他汀 (combretastatin) ; 亚叶酸 (leucovorin) (LV) ; 奥沙利铂 (oxaliplatin), 包括奥沙利铂治疗方案 (FOLFOX) ; PKC- α 、Raf、H-Ras、和 EGFR (例如 erlotinib (Tarceva™)) 的、降低细胞增殖的抑制剂 ; 及任何上述物质的药学可接受的盐、酸或衍生物。

[0076] 该定义还包括作用于调节或抑制激素对肿瘤作用的抗激素剂诸如抗雌激素类和选择性雌激素受体调控剂类 (SERM), 包括例如他莫昔芬 (tamoxifen) (包括 **NOLVADEX®** 他莫昔芬)、雷洛昔芬 (raloxifene)、屈洛昔芬 (droloxifene)、4- 羟基他莫昔芬、曲沃昔芬 (trioxifene)、那洛昔芬 (keoxifene)、LY117018、奥那司酮 (onapristone) 和 **FARESTON®** 托瑞米芬 (toremifene) ; 抑制在肾上腺中调节雌激素生成的芳香酶的芳香酶抑制剂, 诸如例如 4(5)-咪唑、氨基鲁米特 (aminoglutethimide)、**MEGASE®** 醋酸甲地孕酮 (megestrolacetate)、**AROMASIN®** 依西美坦 (exemestane)、福美坦 (formestane)、法偭唑 (fadrozole)、**RIVISOR®** 伏罗唑 (vorozole)、**FEMARA®** 来曲唑 (letrozole) 和 **ARIMIDEX®** 阿那曲唑 (anastrozole) ; 抗雄激素类, 诸如氟他米特 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide)、比卡米特 (bicalutamide)、亮丙瑞林 (leuprolide)、和戈舍瑞林 (goserelin) ; 以及曲沙他滨 (troxacitabine) (1,3- 二氧戊环核苷胞嘧啶类似物) ; 反义寡核苷酸, 特别是抑制牵涉异常 (abherent) 细胞增殖的信号途经中的基因表达的反义寡核苷酸, 诸如例如 PKC- α 、Raf 和 H-Ras ; 核酶, 诸如 VEGF 表达抑制剂 (例如 **ANGIOZYME®** 核酸) 和 HER2 表达抑制剂 ; 疫苗, 诸如基因疗法疫苗, 例如 **ALLOVECTIN®** 疫苗、**LEUVECTIN®** 疫苗和 **VAXID®** 疫苗 ; **PROLEUKIN®** rIL-2 ; **LURTOTECAN®** 拓扑异构酶 1 抑制剂 ; **ABARELIX®** rmRH ; 长春瑞滨 (Vinorelbine) 和埃斯波霉素 (Esperamicins) (见美国专利 No. 4, 675, 187) ; 及任何上述物质的药学可接受的盐、酸或衍生物。

[0077] 术语“前体药物”在用于本申请时指与母药 (parent drug) 相比对患病细胞的细胞毒性较小并能够酶促活化或转变为更具活性母药形式的药用活性物质 (例如小分子) 的前体或衍生物形式。参见例如 Wilman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy”, Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) 和

Stella等,“Prodrugs :A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery”,Directed Drug Delivery, Borchardt 等,编, pp. 247-267, Humana Press (1985)。本发明的前体药物包括但不限于含磷酸盐 / 酯前体药物、含硫代磷酸盐 / 酯前体药物、含硫酸盐 / 酯前体药物、含肽前体药物、D-氨基酸修饰前体药物、糖基化前体药物、含 β -内酰胺前体药物、含任选取代苯氧基乙酰胺的前体药物或含任选取代苯乙酰胺的前体药物、可转化为更具活性而无细胞毒性的药物的 5-氟胞嘧啶和其它 5-氟尿苷前体药物。可衍生为本发明使用的前体药物形式的细胞毒性药物的例子包括但不限于上文描述的那些化疗剂。

[0078] “分离的”,在用于描述本文中所公开的各种多肽时,意指已经鉴定且与 / 自表达它的细胞或细胞培养物分开和 / 或回收的多肽。多肽的天然环境的污染性成分指通常会干扰其诊断或治疗用途的物质,可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选的实施方案中,将多肽纯化至 (1) 足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N-末端或内部氨基酸序列的程度,或 (2) 根据使用考马斯蓝或优选银染色的非还原性或还原性条件下的 SDS-PAGE,达到同质。既然多肽的天然环境的至少一种成分不会存在,那么分离的多肽包括重组细胞内的原位多肽。然而,分离的多肽通常通过至少一个纯化步骤来制备。

[0079] “分离的”多肽编码核酸或其它多肽编码核酸指已经鉴定且与多肽编码核酸的天然来源中通常与之关联的至少一种污染性核酸分子分开的核酸分子。分离的多肽编码核酸分子不同于在自然界中发现它时的形式或背景。分离的多肽编码核酸分子因此与存在于天然细胞中时的特定多肽编码核酸分子有区别。然而,分离的多肽编码核酸分子包括通常表达该多肽的细胞中所包含的多肽编码核酸分子,例如当所述核酸分子在所述细胞中的染色体定位不同于它在天然细胞中的染色体定位时。

[0080] 术语“控制序列”指在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的 DNA 序列。例如,适于原核生物的控制序列包括启动子、任选的操纵基因序列、和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多腺苷酸化信号、和增强子。

[0081] 若一段核酸与另一段核酸序列处于功能性相互关系中,则它是“可操作连接的”。例如,若前序列 (presequence) 或分泌前导 (secretory leader) 的 DNA 表达成参与多肽分泌的前蛋白质 (preprotein),则它与该多肽的 DNA 可操作连接;若启动子或增强子影响编码序列的转录,则它与该序列可操作连接;或者,若核糖体结合位点的位置促进翻译,则它与编码序列可操作连接。一般而言,“可操作连接的”意味着相连的 DNA 序列是相邻的,而且在分泌前导的情况中意味着相邻且处于阅读状态。然而,增强子不必相邻。连接可以通过在方便的限制性位点处的连接来实现。若没有此类位点,则依照常规实践使用合成的寡核苷酸接头或接头。

[0082] 如本文中所定义的,“严格条件”或“高严格条件”可以定义如下:(1) 对于洗涤使用低离子强度和高温,例如 0.015M 氯化钠 / 0.0015M 柠檬酸钠 / 0.1% 十二烷基硫酸钠, 50°C ; (2) 在杂交期间使用变性剂,诸如甲酰胺,例如,50% (v/v) 甲酰胺及 0.1% 牛血清清蛋白 / 0.1% Ficoll / 0.1% 聚乙烯吡咯烷酮 / 具有 750mM 氯化钠, 75mM 柠檬酸钠的 50mM 磷酸钠缓冲液 pH 6.5, 42°C, 或 (3) 在使用 50% 甲酰胺, 5x SSC (0.75M NaCl, 0.075M 柠檬酸钠), 50mM 磷酸钠 (pH 6.8), 0.1% 焦磷酸钠, 5x Denhardt 氏溶液, 超声处理的鲑精 DNA (50 μ g/ml), 0.1% SDS 和 10% 硫酸右旋糖苷的溶液中于 42°C 杂交过夜,于 42°C 在 0.2x SSC (氯化

钠 / 柠檬酸钠) 中洗涤 10 分钟,接着是于 55°C 由含有 EDTA 的 0.1x SSC 组成的 10 分钟高严格洗涤。

[0083] 关于本文中所鉴定的多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为对比序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后,且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分时,候选序列中与所比较多肽中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。为测定百分比氨基酸序列同一性目的的对比可以本领域技术范围内的多种方式进行,例如使用公众可得到的计算机软件,诸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可决定用于测量对比的适宜参数,包括对所比较序列全长获得最大对比所需的任何算法。然而,为了本发明的目的,%氨基酸序列同一性值是使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 获得的。ALIGN-2 序列比较计算机程序由 Genentech 公司编写,而且源代码(表 1)已经连同用户文档一起提交给美国版权局(US Copyright Office, Washington D. C., 20559),并以美国版权注册号 TXU510087 注册。公众可通过 Genentech 公司(South San Francisco, California)得到 ALIGN-2 程序。ALIGN2 程序应当编译成在 UNIX 操作系统,优选数码 UNIX V4.0D 上使用。所有序列比较参数由 ALIGN-2 程序设定且不变。

[0084] 本文所述氨基酸序列是连续的氨基酸序列,除非另有说明。

[0085] 在用于本文时,术语“免疫粘附素”指将异源蛋白质(“粘附素”)的结合特异性与免疫球蛋白恒定域的效应器功能联合起来的抗体样分子。在结构上,免疫粘附素包括具有不同于抗体抗原识别和结合位点(即是“异源”的)的期望结合特异性的氨基酸序列和免疫球蛋白恒定域序列的融合物。免疫粘附素分子的粘附素部分典型的是至少包含受体或配体(诸如 VEGFR 或纤连蛋白配体)的结合位点的连续氨基酸序列。免疫粘附素中的免疫球蛋白恒定域序列可以从任何免疫球蛋白获得,诸如 IgG-1、IgG-2、IgG-3 或 IgG-4 亚型、IgA(包括 IgA-1 和 IgA-2)、IgE、IgD 或 IgM。常常包含衍生自特异性结合靶物的序列的噬菌体展示选择的序列且其融合至免疫球蛋白 Fc 部分的肽体(peptibody)可以视为本文中的免疫粘附素。

[0086] 术语“抗体”以最广义使用,明确覆盖例如单克隆抗体(包括激动性、拮抗性和中和性抗体)、具有多表位特异性的抗体组合物、多克隆抗体、单链抗体、及抗体片段(见下文),只要它们特异性结合天然多肽和/或展现出本发明的生物学活性或免疫学活性。依照一个实施方案,抗体结合寡聚体形式的靶蛋白,例如三聚体形式。依照另一个实施方案,抗体特异性结合蛋白质,该结合可受到本发明单克隆抗体(例如本发明保藏的抗体等)的抑制。短语抗体的“功能性片段或类似物”指与所指抗体具有共同的定性生物学活性的化合物。例如,本发明抗体的功能性片段或类似物可以是能特异性结合 VEGF 或 $\alpha 5 \beta 1$ 的功能性片段或类似物。在一个实施方案中,抗体能阻止或实质性降低 VEGF 诱导细胞增殖的能力。

[0087] “分离的”抗体指已经鉴定且自其天然环境的一种成分分开和/或回收的抗体。其天然环境的污染性成分指将会干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质,可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选的实施方案中,将抗体纯化至(1)根据 Lowry 法的测定,抗体重量超过 95%,最优选重量超过 99%,(2)足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N-末端或内部氨基酸序列的程度,或(3)根据还原性或非还原性条件下的 SDS-PAGE 及使用考马斯蓝或优选的银染色,达到同质。既然抗体天然环境的至少一种成

分不会存在,那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而,分离的抗体通常将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0088] 基本的4链抗体单元是由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)构成的异四聚体糖蛋白(IgM抗体由5个基本的异四聚体单元及称作J链的另外多肽组成,因此包含10个抗原结合位点;而分泌型IgA抗体可聚合而形成包含2-5个基本的4链单元及J链的多价装配物)。在IgG的情况中,4链单元通常是约150,000道尔顿。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而两条重链通过一个或多个二硫键彼此相连,二硫键的数目取决于重链的同种型。每条重链和轻链还具有间隔规律的链内二硫桥。每条重链在N-末端具有一个可变域(V_H),接着是三个(对于 α 和 γ 链)或四个(对于 μ 和 ϵ 同种型)恒定域(C_H)。每条轻链在N-末端具有一个可变域(V_L),接着是其另一端的一个恒定域(C_L)。 V_L 与 V_H 排列在一起,而 C_L 与重链第一恒定域(C_{H1})排列在一起。认为特定的氨基酸残基在轻链和重链可变区之间形成界面。一个 V_H 和一个 V_L 一起配对而形成抗原结合位点。关于不同类别抗体的结构和性质,参见例如《Basic and Clinical Immunology》,第8版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr 和 Tristram G. Parslow(编), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994,第71页和第6章。

[0089] 根据其恒定域氨基酸序列,来自任何脊椎动物物种的L链可归入两种截然不同类型中的一种,称作卡帕(κ)和拉姆达(λ)。根据其重链恒定域(C_H)氨基酸序列,免疫球蛋白可归入不同的类别或同种型。有五类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,分别具有称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链。根据 C_H 序列和功能的较小差异, γ 和 α 类可进一步分为亚类,例如人类表达下列亚类:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。

[0090] 术语“可变的”指可变域中的某些区段在抗体间序列差异广泛的实情。V结构域介导抗原结合并限定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,变异性并非均匀分布于可变域跨越的110个氨基酸。事实上,V区由15-30个氨基酸,称作框架区(FR)的相对不变异的区段及将框架区分开的每个长度为9-12个氨基酸,称作“高变区”的极度变异的较短区域组成。天然重链和轻链的可变域各自包含四个FR,它们大多采取 β -折叠片构象,通过形成环状连接且在有些情况中形成 β -折叠片结构一部分的三个高变区连接。每条链中的高变区通过FR非常接近的保持在一起,并与另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991))。恒定域不直接参与抗体与抗原的结合,但展现出多种效应器功能,诸如抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)中抗体的参与。

[0091] 术语“高变区”在用于本文时指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区一般包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如 V_L 中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)附近及 V_H 中的残基31-35B(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)附近(在一个实施方案中,H1在残基31-35附近);Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))和/或那些来自“高变环”的残基(例如 V_L 中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)及 V_H 中的残基26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3);Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))。

[0092] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体,即构成群体的各抗体个体是相同的,除了可以以极少量存在的可能的天然存在突变形式外。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一抗原性位点。此外,与包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。在它们的特异性之外,单克隆抗体的优势在于它们可以在未受到其它抗体污染的情况中合成。修饰语“单克隆”不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如,可用于本发明的单克隆抗体可通过最初由 Kohler 等 Nature 256:495(1975) 记载的杂交瘤方法来制备,或者可通过重组 DNA 方法在细菌、真核动物或植物细胞中制备(参见例如美国专利 No. 4,816,567)。“单克隆抗体”还可使用例如 Clackson 等 Nature 352:624-628(1991);Marks 等 J.Mol. Biol. 222:581-597(1991) 和下文实施例中记载的技术从噬菌体抗体库分离。

[0093] 单克隆抗体在本文中包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们展现出本发明的生物学活性(参见美国专利 No. 4,816,567;Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984))。本文中感兴趣的嵌合抗体包括包含衍生自非人灵长类动物(例如旧大陆猴类(Old World Monkey)、猿等)的可变域抗原结合序列和人恒定区序列的“灵长类化”抗体。

[0094] “完整抗体”指包含抗原结合位点以及 C_L 和至少重链恒定域 C_H1、C_H2 和 C_H3 的抗体。恒定域可以是天然序列恒定域(例如人天然序列恒定域)或其氨基酸序列变体。优选的是,完整抗体具有一项或多项效应器功能。

[0095] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选完整抗体的抗原结合或可变区。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段;双抗体;线性抗体(参见美国专利 No. 5,641,870,实施例 2;Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995));单链抗体分子;及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0096] 表述“线性抗体”一般指 Zapata et al., Protein Eng, 8(10):1057-1062(1995) 中所描述的抗体。简言之,这些抗体包含一对串联的 Fd 区段(VH-CH1-VH-CH1),该区段与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的,或者是单特异性的。

[0097] 用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称作“Fab”片段,和一个残余“Fc”片段,其名称反映了它易于结晶的能力。Fab 片段由一条完整轻链及一条重链的可变域(V_H)和第一恒定域(C_H1)组成。每个 Fab 片段对于抗原结合是单价的,即它具有一个抗原结合位点。胃蛋白酶处理抗体产生一个较大 F(ab')₂ 片段,它粗略相当于两个通过二硫键相连的 Fab 片段,具有二价抗原结合活性且仍能够交联抗原。Fab' 片段因在 C_H1 结构域的羧基末端增加了少数残基而与 Fab 片段有所不同,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH 是本文中对其中恒定域半胱氨酸残基携带一个游离硫醇基的 Fab' 的称谓。F(ab')₂ 抗体片段最初是作为成对 Fab' 片段生成的,在 Fab' 片段之间具有铰链半胱氨酸。还知道抗体片段的其它化学偶联形式。

[0098] Fc 片段包含通过二硫键保持在一起的两条重链的羧基末端部分。抗体的效应器功能是由 Fc 区中的序列决定的,该区还是受到在某些类型细胞上发现的 Fc 受体(FcR)识别

的部分。

[0099] “Fv”是包含完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。此片段由紧密、非共价结合的一个重链可变区和一个轻链可变区的二聚体组成。从这两个结构域的折叠中散发出六个高变环（重链和轻链各3个环），贡献出抗原结合的氨基酸残基并赋予抗体以抗原结合特异性。然而，即使是单个可变域（或只包含对抗原特异的三个CDR的半个Fv）也具有识别和结合抗原的能力，尽管亲和力低于完整结合位点。

[0100] “单链Fv”，也可缩写为“sFv”或“scFv”，是包含连接成一条多肽链的抗体 V_H 和 V_L 结构域的抗体片段。优选的是，sFv多肽在 V_H 和 V_L 结构域之间还包含多肽接头，使得sFv形成抗原结合期望的结构。关于sFv的综述参见Pluckthun, 于《The Pharmacology of Monoclonal Antibodies》, vol. 113, Rosenberg和Moore编, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315, 1994; Borrebaeck 1995, 见下文。

[0101] 术语“双抗体”指通过在 V_H 和 V_L 结构域之间使用短接头（约5-10个残基）构建sFv片段（见上一段）而制备的小型抗体片段，由于接头短，使得V结构域实行链间而非链内配对，导致二价片段，即具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双抗体是两个“交叉”sFv片段的异二聚体，其中两种抗体的 V_H 和 V_L 结构域存在于不同多肽链上。双抗体更完整的描述于例如EP 404, 097; W093/11161; Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)。

[0102] 非人（例如啮齿类）抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人抗体的序列的嵌合抗体。在极大程度上，人源化抗体指人免疫球蛋白（受体抗体）中的高变区残基用具有期望抗体特异性、亲和力和能力的非人物种（供体抗体）诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中，将人免疫球蛋白的框架区（FR）残基用相应的非人残基替换。此外，人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有发现的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。通常，人源化抗体包含至少一个、通常两个基本上整个如下可变域，其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环，且所有或基本上所有FR是人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体任选还包含至少部分免疫球蛋白恒定区（Fc），通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)。

[0103] “物种依赖性抗体”指对来自第一哺乳动物物种的抗原具有强于该抗原来自第二哺乳动物物种的同系物的结合亲和力的抗体。通常，物种依赖性抗体“特异性结合”人类抗原（即具有不超过约 $1 \times 10^{-7}M$ ，优选不超过约 $1 \times 10^{-8}M$ ，最优选不超过约 $1 \times 10^{-9}M$ 的结合亲和力（Kd），但是对该抗原来自第二非人哺乳动物物种的同系物具有比其对人类抗原的结合亲和力弱至少约50倍，或至少约500倍，或至少约1000倍的结合亲和力。物种依赖性抗体可以是上文定义的各种类型抗体，但是优选人源化抗体或人抗体。

[0104] 在此类实施方案中，根据荧光激活细胞分选（FACS）分析或放射免疫沉淀（RIA）的测定，多肽、抗体、拮抗剂或组合物结合“非靶物”蛋白质的程度将小于该多肽、抗体、拮抗剂或组合物对其特定靶物蛋白质的结合的约10%。对于多肽、抗体、拮抗剂或组合物对靶分子的结合，术语“特异结合”或“特异性结合”特定多肽或特定多肽靶物上的表位或对其“特异”意味着可测量的不同于非特异相互作用的结合。特异结合可通过例如测定分子的结合

并与对照分子的结合比较来测量,所述对照分子通常是结构相似但没有结合活性的分子。例如,特异结合可通过与对照分子的竞争来测定,所述对照分子与靶物相似,例如过量的未标记靶物。在这种情况下,若经标记靶物与探针的结合受到过量未标记靶物的竞争性抑制,则指示特异结合。术语“特异结合”或“特异性结合”特定多肽或特定多肽靶物上的表位或对其“特异”在用于本文时可由例如对靶物的 K_d 为至少约 $10^{-4}M$,或至少约 $10^{-5}M$,或至少约 $10^{-6}M$,或至少约 $10^{-7}M$,或至少约 $10^{-8}M$,或至少约 $10^{-9}M$,或至少约 $10^{-10}M$,或至少约 $10^{-11}M$,或至少约 $10^{-12}M$ 或更大的分子展现。在一个实施方案中,术语“特异结合”指这样的结合,其中分子结合特定多肽或特定多肽上的表位,而基本上不结合任何其它多肽或多肽表位。

[0105] 抗体“效应器功能”指那些可归于抗体 Fc 区(天然序列 Fc 区或氨基酸序列变体 Fc 区)且随抗体同种型而变化的生物学活性。抗体效应器功能的例子包括:C1q 结合和补体依赖性细胞毒性;Fc 受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体下调;和 B 细胞活化。

[0106] “天然序列 Fc 区”包含与自然界中找到的 Fc 区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。Fc 序列的例子记载于例如但不限于 Kabat 等,《Sequences of Immunological Interest》,第 5 版,Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md, 1991。

[0107] “变异 Fc 区”包含由于至少一处本文所定义的“氨基酸修饰”而与天然序列 Fc 区有所不同的氨基酸序列。优选的是,变异 Fc 区具有与天然序列 Fc 区或与亲本多肽的 Fc 区相比至少一处氨基酸替代,例如在天然序列 Fc 区中或在亲本多肽的 Fc 区中具有约 1 处至约 10 处氨基酸替代,优选约 1 处至约 5 处氨基酸替代。在一个实施方案中,变异 Fc 区在本文中将与天然序列 Fc 区拥有至少约 80% 的同源性,至少约 85% 的同源性,至少约 90% 的同源性,至少约 95% 的同源性或至少约 99% 的同源性。根据另一个实施方案,变异 Fc 区在本文中将与亲本多肽的 Fc 区拥有至少约 80% 的同源性,至少约 85% 的同源性,至少约 90% 的同源性,至少约 95% 的同源性或至少约 99% 的同源性。

[0108] 关于本文中所鉴定的多肽和抗体序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”或“同源性”定义为对比序列且将任何保守替代视为序列同一性的一部分时,候选序列中与所比较多肽中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。为测定百分比氨基酸序列同一性目的的对比可以本领域技术范围内的多种方式进行,例如使用公众可得到的计算机软件,诸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可决定用于测量对比的适宜参数,包括对所比较序列全长获得最大对比所需的任何算法。然而,为了本发明的目的,%氨基酸序列同一性值是使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 获得的。ALIGN-2 序列比较计算机程序由 Genentech 公司编写,而且源代码已经连同用户文档一起提交给美国版权局 (US Copyright Office, Washington D. C., 20559),并以美国版权注册号 TXU510087 注册。公众可通过 Genentech 公司 (South San Francisco, California) 得到 ALIGN-2 程序。ALIGN2 程序应当编译成在 UNIX 操作系统,优选数码 UNIX V4.0D 上使用。所有序列比较参数由 ALIGN-2 程序设定且不变。

[0109] 术语“含 Fc 区多肽”指包含 Fc 区的多肽,诸如抗体或免疫粘附素(见下文定义)。Fc 区的 C-末端赖氨酸(依照 EU 编号系统的残基 447)可以消除,例如在纯化多肽的过程中或者通过重组改造编码多肽的核酸。因此,依照本发明包含具有 Fc 区的多肽(包括抗体)的组合物可包含所有 K447 残基都被消除的多肽群体、无一 K447 残基被消除的多肽群体、或

具有 K447 残基的多肽与没有 K447 残基的多肽的混合物。

[0110] 贯穿本说明书和权利要求书, Kabat 编号系统一般在提及可变域中的残基(大约是轻链残基 1-107 和重链残基 1-113)时使用(例如 Kabat 等,《Sequences of Immunological Interest》, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md, 1991)。“EU 编号系统”或“EU 指数”一般在提及免疫球蛋白重链恒定区中的残基时使用(例如 Kabat 等,《Sequences of Proteins of Immunological Interest》, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中报道的 EU 指数, 明确收入本文作为参考)。除非本文中另有说明, 提及抗体可变域中的残基编号指根据 Kabat 编号系统的残基编号方式。除非本文中另有说明, 提及抗体恒定域中的残基编号指根据 EU 编号系统的残基编号方式。

[0111] 术语“Fc 受体”或“FcR”用于描述结合抗体 Fc 区的受体。在一个实施方案中, 本发明的 FcR 指结合 IgG 抗体的 FcR(γ 受体), 包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体, 包括这些受体的等位变体和可变剪接形式。Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA (“活化受体”)和 Fc γ RIIB (“抑制受体”), 它们具有相似的氨基酸序列, 区别主要在于其胞质结构域。活化受体 Fc γ RIIA 在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体 Fc γ RIIB 在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见综述 Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15 :203-234(1997))。该术语包括同种异型(allotype), 诸如 Fc γ RIIIa 同种异型:Fc γ RIIIA-Phe158、Fc γ RIIIA-Val158、Fc γ RIIA-R131 和 / 或 Fc γ RIIA-H131。FcR 的综述参见 Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9 :457-492(1991); Capel et al., Immunomethods 4 :25-34(1994); de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126 :330-41(1995)。术语“FcR”在本文中涵盖其它 FcR, 包括那些未来将会鉴定的。该术语还包括新生儿受体, FcRn, 它负责将母体 IgG 转移给胎儿(Guyer et al., J. Immunol. 117 :587(1976); Kim et al., J. Immunol. 24 :249(1994))。

[0112] 术语“FcRn”指新生儿 Fc 受体(FcRn)。FcRn 在结构上与主要组织相容性复合物(MHC)相似, 由非共价结合的 α -链和 β 2-微球蛋白组成。新生儿 Fc 受体 FcRn 的多种功能的综述见 Ghetie and Ward(2000)Annu. Rev. Immunol. 18, 739-766。FcRn 在免疫球蛋白 IgG 自母体被动投递至幼仔和调节血清 IgG 水平中发挥作用。FcRn 可起到补救受体的作用, 即在细胞中和穿越细胞结合和转运完整形式的被胞饮 IgG, 并挽救它们免于默认的降解途径。

[0113] W000/42072(Presta) 和 Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2) :6591-6604(2001) 记载了对 FcR 的结合得到改良或消除的抗体变体。将这些出版物的内容明确收入本文作为参考。

[0114] 人 IgG Fc 区的“CH1 结构域”(也称为“C1”或“H1”结构域)通常自大约氨基酸 118 延伸至大约氨基酸 215(EU 编号系统)。

[0115] “铰链区”通常定义为自人 IgG1 的 Glu216 至 Pro230 的区段(Burton, Molec. Immunol. 22 :161-206(1985))。其它 IgG 同种型的铰链区可以通过将第一个和最后一个形成重链间 S-S 键的半胱氨酸残基置于相同位置而与 IgG1 序列对比。

[0116] Fc 区的“低级铰链区”通常定义为紧挨着铰链区 C-末端的一段残基, 即 Fc 区的残基 233-239。在先前的报告中, FcR 结合一般归功于 IgG Fc 区的低级铰链区中氨基酸残基。

[0117] 人 IgG Fc 区的“CH2 结构域”（也称为“C2”或“H2”结构域）通常自大约氨基酸 231 延伸至大约氨基酸 340。CH2 结构域的独特之处在于它没有与另一结构域紧密配对。而是，有两个 N- 连接的分支的碳水化合物链介于完整天然 IgG 分子的两个 CH2 结构域之间。推测碳水化合物可能提供结构域-结构域配对的替代且有助于稳定 CH2 结构域。Burton, *Molec. Immunol.* 22 :161-206 (1985)。

[0118] “CH3 结构域”（也称为“C3”或“H3”结构域）包含 Fc 区中 CH2 结构域 C- 末端的一段残基（即自抗体序列的大约氨基酸残基 341 至 C 末端，通常是 IgG 的氨基酸残基 446 或 447）。

[0119] “功能性 Fc 区”拥有天然序列 Fc 区的“效应器功能”。例示性的“效应器功能”包括 C1q 结合、补体依赖性细胞毒性、Fc 受体结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)、吞噬作用、细胞表面受体（例如 B 细胞受体 ;BCR）下调等。此类效应器功能一般要求 Fc 区与结合结构域（例如抗体可变域）联合，而且可使用多种测定法来评估，例如本文中公开的。

[0120] “C1q”指包含供免疫球蛋白 Fc 区结合的位点的多肽。C1q 与两种丝氨酸蛋白酶即 C1r 和 C1s 一起形成复合物 C1，即补体依赖性细胞毒性 (CDC) 途径的第一组分。人 C1q 可购自例如 Quidel, San Diego, CA。

[0121] 术语“结合结构域”指多肽中能结合另一分子的区域。在 FcR 的情况下，结合结构域可以包含其多肽链（例如其 α 链）中负责 Fc 结合的部分。一种有用的结合结构域是 FcR α 链的胞外结构域。

[0122] 具有 FcR 结合亲和力或 ADCC 活性“改变”了的变异 IgG Fc 的抗体或肽体指与亲本多肽或者与包含天然序列 Fc 区的多肽相比 FcR 结合活性（例如 Fc γ R 或 FcRn）和 / 或 ADCC 活性得到增强或减弱的抗体或肽体。“展现出对 FcR 的结合增加”的变异 Fc 以高于亲本多肽或天然序列 IgG Fc 的亲和力（例如更低的表观 Kd 或 IC50 值）结合至少一种 FcR。依照一些实施方案，与亲本多肽相比结合的增强是约 3 倍，优选约 5 倍、10 倍、25 倍、50 倍、60 倍、100 倍、150 倍、200 倍、直到 500 倍，或结合改进约 25% 到 1000%。“展现出对 FcR 的结合减少”的多肽变体以低于亲本多肽的亲和力（例如更高的表观 Kd 或更高的 IC50 值）结合至少一种 FcR。与亲本多肽相比结合的减弱可以是约 40% 或结合的更多降低。

[0123] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”指其中结合到某些细胞毒性细胞（例如天然杀伤 (NK) 细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞）上存在的 Fc 受体 (FcR) 上的分泌型 Ig 使得这些细胞毒性效应细胞能够特异性结合携带抗原的靶细胞，随后用细胞毒素杀死靶细胞的细胞毒性形式。该抗体“武装” (arm) 细胞毒性细胞，而且是此类杀伤作用绝对要求的。介导 ADCC 的主要细胞，即 NK 细胞，只表达 Fc γ RIII，而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9 :457-92 (1991) 第 464 页表 3 总结了造血细胞上的 FcR 表达。为了评估感兴趣分子的 ADCC 活性，可进行体外 ADCC 测定法，诸如美国专利 No. 5, 500, 362 或 5, 821, 337 或下文实施例中所记载的。可用于此类测定法的效应细胞包括外周血单个核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。或者 / 另外，可在体内评估感兴趣分子的 ADCC 活性，例如在动物模型中，诸如 Clynes et al., *PNAS(USA)* 95 : 652-656 (1998) 中所披露的。

[0124] 包含“展现出增强的 ADCC”或在存在人效应细胞时比具有野生型 IgG Fc 的多肽或

亲本多肽更有效的介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 的变异 Fc 区的多肽指在具有变异 Fc 区的多肽和具有野生型 Fc 区的多肽 (或亲本多肽) 在测定中的量基本上相同时, 在体外或在体内实质性更有效的介导 ADCC 的多肽。一般而言, 此类变体使用本文中所披露的体外 ADCC 测定法来鉴定, 但是涵盖用于测定 ADCC 活性的其它测定法或方法, 例如在动物模型中。在一个实施方案中, 优选的变体在介导 ADCC 方面比野生型 Fc (或亲本多肽) 更加有效, 约 5 倍到约 100 倍, 例如约 25 倍到约 50 倍。

[0125] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”指存在补体时对靶细胞的溶解。经典补体途径的激活是由补体系统第一组分 (C1q) 结合其关联抗原所结合的抗体 (适宜亚类的) 起始的。为了评估补体激活, 可进行 CDC 测定法, 例如如 Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202 :163 (1996) 中所记载的。

[0126] 具有改变的 Fc 区氨基酸序列和增强的或减弱的 C1q 结合能力的多肽记载于美国专利 No. 6, 194, 551B1 和 W099/51642。将这些专利出版物的内容明确收入本文作为参考。还可参见 Idusogie et al., J. Immunol. 164 :4178-4184 (2000)。

[0127] “人效应细胞”指表达一种或多种 FcR 并行行使效应器功能的白细胞。依照一个实施方案, 该细胞至少表达 Fc γ RIII 并行行使 ADCC 效应器功能。介导 ADCC 的人白细胞的例子包括外周血单个核细胞 (PBMC)、天然杀伤 (NK) 细胞、单核细胞、细胞毒性 T 细胞和嗜中性粒细胞, 优选 PBMC 和 NK 细胞。效应细胞可以从其天然来源分离, 例如如本文所述从血液或 PBMC 分离。

[0128] 用于测量 FcRn 结合的方法是已知的 (参见例如 Ghetie 1997, Hinton 2004), 而且记载于下文实施例。人 FcRn 高亲和力结合多肽对人 FcRn 的体内结合和血清半衰期可以在例如表达人 FcRn 的转基因小鼠或转染人细胞系中, 或者在施用了 Fc 变异多肽的灵长类动物中测定。在一个实施方案中, 具体而言, 具有变异 IgG Fc 的本发明抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体展现出比具有野生型 IgG Fc 的多肽升高的结合亲和力, 升高至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、至少 50 倍、至少 60 倍、至少 70 倍、至少 80 倍、至少 100 倍、至少 125 倍、至少 150 倍。在一个具体的实施方案中, 对人 FcRn 的结合亲和力提高了约 170 倍。

[0129] 关于对 FcRn 的结合亲和力, 在一个实施方案中, 多肽的 EC50 或表观 Kd (在 pH6.0) 小于 1 μ M, 更优选小于或等于 100 nM, 更优选小于或等于 10 nM。在一个实施方案中, 关于升高的对 Fc γ RIII (F158; 即低亲和力同种型) 的结合亲和力, EC50 或表观 Kd 小于或等于 10 nM, 而对 Fc γ RIII (V158; 高亲和力同种型), EC50 或表观 Kd 小于或等于 3 nM。依照另一个实施方案, 若测试抗体和对照抗体结合曲线在中点处的吸光度数值的比例 (例如 $A_{450\text{nm}}(\text{抗体})/A_{450\text{nm}}(\text{非抗体})$) 小于或等于 40%, 则抗体对 Fc 受体的结合相对于对照抗体 (例如 **Herceptin®** 抗体) 的降低可以认为是相对于对照抗体显著的。依照另一个实施方案, 若测试抗体和对照抗体结合曲线在中点处的吸光度数值的比例 (例如 $A_{450\text{nm}}(\text{抗体})/A_{450\text{nm}}(\text{对照抗体})$) 大于或等于 125%, 则抗体对 Fc 受体的结合相对于对照抗体 (例如 **Herceptin®** 抗体) 的升高可以认为是相对于对照抗体显著的。参见例如实施例 16。

[0130] “亲本多肽”或“亲本抗体”指包含产生变异多肽或抗体的氨基酸序列且所述变异多肽或抗体与之进行比较的多肽或抗体。典型的是, 亲本多肽或亲本抗体缺少一处或多处本文中所公开的 Fc 区修饰且与本文中所公开的多肽变体相比在效应器功能方面有所不同。亲本多肽可以包含天然序列 Fc 区或具有预先存在氨基酸序列修饰 (诸如添加、删除和

/或替代)的Fc区。

[0131] 本发明的抗体可以衍生自噬菌体展示。在用于本文时,“文库”或“库”指众多抗体或抗体片段序列,或者编码这些序列的核酸,这些序列在根据本发明方法导入这些序列的变异氨基酸组合方面是不同的。

[0132] “噬菌体展示”是一种将变异多肽作为与外壳蛋白至少一部分的融合蛋白展示在噬菌体(例如丝状噬菌体)颗粒表面上的技术。噬菌体展示的效用在于能够对随机化蛋白质变体的大型文库快速且高效分选那些能以高亲和力与靶抗原结合的序列的实情。肽和蛋白质文库在噬菌体上的展示已经用于对数以百万计的多肽筛选那些具有特异性结合特性的多肽。多价噬菌体展示法已经用于展示小随机肽和小蛋白,其通过与丝状噬菌体的基因 III 或基因 VIII 融合来实现。Wells and Lowman, Curr. Opin. Struct. Biol. 3: 355-362(1992),及其中引用的参考文献。在单价噬菌体展示中,将蛋白质或肽文库与基因 III 或其一部分融合,并在存在野生型基因 III 蛋白时以低水平表达,使得噬菌体颗粒展示一个拷贝的融合蛋白或者不展示融合蛋白。亲合效应(avidity effect)相对于多价噬菌体得到了降低,使得分选基于内在的配体亲和力,而且使用噬菌粒载体,这简化了 DNA 操作。Lowman and Wells, Methods: A companion to Methods in Enzymology 3: 205-0216(1991)。

[0133] “噬菌粒”是具有细菌复制起点(例如 CoIE1)和一个拷贝的噬菌体基因区间的质粒载体。噬菌粒可利用任何已知噬菌体,包括丝状噬菌体和 λ 类噬菌体。质粒一般也包含抗生素抗性的可选择标志物。克隆入这些载体的 DNA 区段可以像质粒一样扩增。在给容纳这些载体的细胞提供生成噬菌体颗粒所必需的所有基因时,质粒的复制模式变成滚环复制,以生成质粒 DNA 的一条链的拷贝,并包装噬菌体颗粒。噬菌粒可形成感染性或非感染性噬菌体颗粒。此术语包括这样的噬菌粒,它们包含与异源多肽基因连接成基因融合物的噬菌体外壳蛋白基因或其片段,使得异源多肽展示在噬菌体颗粒的表面上。

[0134] 术语“噬菌体载体”指包含异源基因且能够复制的双链复制型噬菌体。噬菌体载体具有容许噬菌体复制和噬菌体颗粒形成的噬菌体复制起点。噬菌体优选是丝状噬菌体,诸如 M13、f1、fd、Pf3 噬菌体或其衍生物,或者是 λ 类噬菌体,诸如 λ 、21、 ϕ 80、 ϕ 81、82、424、434 等或其衍生物。

[0135] 对多肽诸如肽体、免疫粘附素、抗体和短肽的共价修饰包括在本发明的范围内。一种类型的共价修饰包括使多肽的靶氨基酸残基与有机衍生试剂反应,该有机衍生试剂能够与多肽的选定侧链或者 N- 或 C- 末端残基起反应。用双功能剂进行的衍生化可用于例如使多肽与不溶于水的支持基质或表面交联,以用于纯化抗体的方法,反之亦然。常用的交联剂包括例如 1,1- 双(重氮乙酰基)-2- 苯乙烷、戊二醛、N- 羟基琥珀酰亚胺酯例如与 4- 叠氮水杨酸形成的酯、同双功能亚氨酸酯包括二琥珀酰亚胺酯诸如 3,3'- 二硫代双(琥珀酰亚胺基-丙酸酯)、双功能马来酰亚胺诸如双-N- 马来酰亚胺-1,8- 辛烷和诸如甲基-3-[(对-叠氮苯基)二硫代]丙酰亚胺酯等试剂。

[0136] 其它修饰包括谷氨酰胺和天冬酰胺残基分别脱酰胺为谷氨酰胺和天冬酰胺残基,脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酸或苏氨酸残基的羟基的磷酸化,赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α - 氨基的甲基化(T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86(1983)), N- 末端胺的乙酰化,及任何 C- 末端羧基的酰胺化。

[0137] 其它修饰包括将毒素偶联至拮抗剂诸如美登素和美登木素生物碱类、加利车霉素和其它细胞毒剂。

[0138] 对多肽的另一类共价修饰包括,以美国专利 Nos. 4,640,835 ;4,496,689 ;4,301,144 ;4,670,417 ;4,791,192 或 4,179,337 所述方式,将多肽与多种非蛋白质性质的聚合物之一连接,例如聚乙二醇 (PEG)、聚丙二醇或聚氧化亚烷基 (polyoxyalkylene)。

[0139] 如果有利的话,还可以以形成嵌合分子的方式修饰本发明的多肽,所述嵌合分子包含与另一种异源多肽或氨基酸序列融合的多肽(例如免疫粘附素或肽体)。

[0140] 在一个实施方案中,此类嵌合分子包括多肽与蛋白质转导结构域的融合物,所述蛋白质转导结构域将多肽靶向投递至多种组织,更具体的说就是穿过血脑屏障,其中使用例如人免疫缺陷病毒 TAT 蛋白的蛋白质转导结构域 (Schwarze et al., 1999, Science 285 : 1569-72)。

[0141] 在另一个实施方案中,此类嵌合分子包括带有标签多肽的多肽的融合物,所述标签多肽提供了抗标签抗体可选择性结合的表位。表位标签通常位于多肽的氨基或羧基末端。此类带表位标签形式的多肽的存在可使用针对所述标签多肽的抗体来检测。而且,表位标签的提供使多肽易于使用抗标签抗体或另一类结合所述表位标签的亲亲和基质通过亲和纯化来纯化。多种标签多肽及其各自抗体是本领域已知的。例子包括多组氨酸 (poly-his) 或多-组氨酸-甘氨酸 (poly-his-gly) 标签;流感 HA 标签多肽及其抗体 12CA5 (Field et al., Mol. Cell. Biol. 8 : 2159-2165 (1988)); c-myc 标签及其抗体 8F9、3C7、6E10、G4、B7 和 9E10 (Evan et al., Molecular and Cellular Biology 5 : 3610-3616 (1985)); 及单纯疱疹病毒糖蛋白 D(gD) 标签及其抗体 (Paborsky et al., Protein Engineering 3(6) : 547-553 (1990))。其它标签多肽包括 Flag 肽 (Hopp et al., BioTechnology 6 : 1204-1210 (1988)); KT3 表位肽 (Martin et al., Science 255 : 192-194 (1992)); α -微管蛋白表位肽 (Skinner et al., J. Biol. Chem. 266 : 15163-15166 (1991)); 及 T7 基因 10 蛋白肽标签 (Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 6393-6397 (1990))。

[0142] 在一个备选实施方案中,嵌合分子可包括多肽与免疫球蛋白或免疫球蛋白特定区域的融合物。对于二价形式的嵌合分子(例如“免疫粘附素”),此类融合物可以是与 IgG 分子 Fc 区的融合。本发明的 Ig 融合物包括大致包含或只包含人的残基 94-243、残基 33-53 或残基 33-52 以置换 Ig 分子内的至少一个可变区的多肽。在一个特别优选的实施方案中,免疫球蛋白融合物包含 IgG1 分子的铰链、CH2 和 CH3,或者铰链、CH1、CH2 和 CH3 区。关于免疫球蛋白融合物的制备还可参见 1995 年 6 月 27 日公告的美国专利 No. 5,428,130。

[0143] 本发明提供了用于抑制或预防复发的肿瘤生长或复发的癌细胞生长的方法和组合物。在各种实施方案中,癌指复发的肿瘤生长或复发的癌细胞生长,其中癌细胞的数目没有显著减少,或者增多了,或者肿瘤体积没有显著缩小,或者增大了,或者癌细胞体积或数目未能有进一步缩小/减少。确定癌细胞是否是复发的肿瘤生长或复发的癌细胞生长可以通过本领域关于测定治疗对癌细胞有效性知道的任何方法在体内或在体外进行。对抗 VEGF 治疗有抗性的肿瘤是复发的肿瘤生长的一个例子。

[0144] 本文中所公开的多肽、抗体、拮抗剂、或组合物的“有效量”指足以实现明确规定的目的的量。“有效量”可凭经验且以已知方法,联系规定的目的来确定。

[0145] 术语“治疗有效量”指在哺乳动物 (aka 患者) 中有效“治疗”疾病或病症的本发明

抗体、多肽、或拮抗剂的量。在癌症的情况中,药物的治疗有效量可减少癌细胞数目;缩小肿瘤体积或重量;抑制(即一定程度的减缓,优选停止)癌细胞浸润到周围器官中;抑制(即一定程度的减缓,优选停止)肿瘤转移;一定程度的抑制肿瘤生长;和/或一定程度的减轻与癌症有关的一种或多种症状。就药物可预防现有癌细胞生长和/或杀死现有癌细胞的程度而言,它可以是细胞抑制性的和/或细胞毒性的。在一个实施方案中,治疗有效量是生长抑制量。在另一个实施方案中,治疗有效量是延长患者存活量。在另一个实施方案中,治疗有效量是改进患者无进展存活量。

[0146] 在伤口愈合的情况中,术语“有效量”或“治疗有效量”指药物有效加速或改进受试者中的伤口愈合的量。治疗剂量指对患者展现出治疗效果的剂量,而亚治疗剂量指对所治疗的患者不展现出治疗效果的剂量。

[0147] “慢性伤口”指不愈合的伤口。参见例如 Lazarus et al., Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing, Arch. Dermatol. 130 :489-93(1994)。慢性伤口包括但不限于例如动脉溃疡、糖尿病性溃疡、压迫性溃疡、静脉溃疡等。急性伤口可以发展成慢性伤口。急性伤口包括但不限于由例如热伤、外伤、手术、大面积皮肤癌切除、深部真菌和细菌感染、血管炎、硬皮病、天疱疮、中毒性表皮坏死松解症等引起的伤口。参见例如 Buford, Wound Healing and Pressure Sores, Healing Well. com, 2001 年 10 月 24 日出版。“正常伤口”指经历正常伤口愈合修复的伤口。

[0148] 本发明多肽、抗体、拮抗剂或组合物的“生长抑制量”指能够在体外或在体内抑制细胞,尤其是肿瘤,例如癌细胞生长的量。本发明多肽、抗体、拮抗剂或组合物为了抑制增生性细胞生长的“生长抑制量”可以凭经验和通过已知方法或本文中提供的例子来确定。

[0149] 本发明多肽、抗体、拮抗剂或组合物的“细胞毒性量”指能够在体外或在体内引起细胞,尤其是肿瘤,例如癌细胞破坏的量。本发明多肽、抗体、拮抗剂或组合物为了抑制增生性细胞生长的“细胞毒性量”可以凭经验和通过本领域已知方法来确定。

[0150] “自身免疫病”在本文中指因个体自身组织引起的和针对个体自身组织的疾病或病症或其共分离(co-segregate)或表现或者由此产生的疾患。自身免疫性疾病或病症的例子包括但不限于关节炎(类风湿性关节炎诸如急性关节炎、慢性类风湿性关节炎、痛风性关节炎、急性痛风性关节炎、慢性炎性关节炎、退行性关节炎、感染性关节炎、莱姆(Lyme)关节炎、增生性关节炎、银屑病性关节炎、脊椎关节炎和幼发型类风湿性关节炎,骨关节炎,慢性进行性关节炎(arthritis chronica progrediente),变形性关节炎,慢性原发性多关节炎,反应性关节炎,和强直性脊柱炎),炎性过度增殖性皮肤病,银屑病诸如斑块状银屑病、滴状银屑病、脓疱性银屑病和指甲银屑病,皮炎包括接触性皮炎、慢性接触性皮炎、变应性皮炎、变应性接触性皮炎、疱疹样皮炎和特应性皮炎,x连锁的高IgM综合征,荨麻疹诸如慢性特发性荨麻疹包括慢性自身免疫性荨麻疹,多肌炎/皮肌炎,青少年型皮肌炎,中毒性表皮坏死松解症,硬皮病(包括系统性硬皮病),硬化诸如系统性硬化、多发性硬化(MS)诸如脊髓-眼(spino-optical)MS、原发性进行性MS和复发性消退性(relapsing-remitting)MS、进行性系统性硬化、动脉粥样硬化、动脉硬化、播散性硬化(sclerosis disseminata)和共济失调性(ataxic)硬化,炎性肠病(IBD)(例如克罗恩氏(Crohn)病,结肠炎诸如溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, colitis ulcerosa)、微观(microscopic)结肠炎、胶原性结肠炎、息肉状结肠炎、坏死性小肠结肠炎和透壁性结肠

炎,和自身免疫性炎性肠病),坏疽性脓皮症,结节性红斑,原发性硬化性胆管炎,巩膜外层炎),呼吸窘迫综合征包括成人型或急性呼吸窘迫综合征(ARDS),脑膜炎,整个或部分葡萄膜的炎症,虹膜炎,脉络膜炎,自身免疫性血液学病症,类风湿性脊椎炎,突发性听觉丧失,IgE介导的疾病诸如过敏反应和变应性和特应性鼻炎,脑炎诸如拉斯默森氏(Rasmussen)脑炎和边缘系和/或脑干脑炎,葡萄膜炎诸如前葡萄膜炎、急性前葡萄膜炎、肉芽肿性葡萄膜炎、非肉芽肿性葡萄膜炎、晶状体抗原性葡萄膜炎、后葡萄膜炎或自身免疫性葡萄膜炎,具有和没有肾病综合征的肾小球肾炎(GN)诸如慢性或急性肾小球肾炎诸如原发性GN、免疫介导的GN、膜性GN(膜性肾病)、特发性膜性GN、膜性增殖性GN(MPGN)包括I型和II型、和急进性GN,变应性疾患,变应性反应,湿疹包括变应性或特应性湿疹,哮喘诸如支气管哮喘(asthma bronchiale, bronchial asthma)和自身免疫性哮喘,涉及T细胞浸润和慢性炎性应答的疾患,慢性肺部炎性疾病,自身免疫性心肌炎,白细胞粘附缺陷,系统性红斑狼疮(SLE)(systemic lupus erythematosus, systemic lupus erythematoses)诸如皮肤SLE、亚急性皮肤红斑狼疮、新生儿狼疮综合征(NLE)、播散性红斑狼疮、狼疮(包括狼疮肾炎、狼疮脑炎、儿科狼疮、非肾狼疮、盘状狼疮、狼疮脱发),幼发型(I型)糖尿病包括儿科胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)、成人期发作的糖尿病(II型糖尿病)、自身免疫性糖尿病、特发性尿崩症,与细胞因子和T-淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏感性有关的免疫应答,结核病,结节病,肉芽肿病包括淋巴瘤样肉芽肿病、韦格纳氏(Wegener)肉芽肿病,粒细胞缺乏,血管炎病包括血管炎(包括大血管血管炎(包括风湿性多肌痛和巨细胞(高安氏(Takayasu))动脉炎),中血管血管炎(包括川崎氏(Kawasaki)病和结节性多动脉炎),微观(microscopic)多动脉炎,CNS血管炎,坏死性、皮肤性或超敏感性血管炎,系统性坏死性血管炎,和ANCA相关血管炎诸如丘-施二氏(Churg-Strauss)血管炎或综合征(CSS)),颞动脉炎,再生障碍性贫血,自身免疫性再生障碍性贫血,库姆斯(Coombs)阳性贫血,戴-布二氏(Diamond Blackfan)贫血,溶血性贫血或免疫性溶血性贫血包括自身免疫性溶血性贫血(AIHA),恶性贫血(pernicious anemia, anemia perniciosa),阿狄森氏(Addison)病,单纯红细胞性贫血或再生障碍(PRCA),因子VIII缺乏,血友病A,自身免疫性嗜中性粒细胞减少症,全血细胞减少症,白细胞减少症,涉及白细胞渗出的疾病,CNS炎性病,多器官损伤综合征诸如那些败血症、外伤或出血继发的,抗原-抗体复合物介导的疾病,抗肾小球基底膜病,抗磷脂抗体综合征,变应性神经炎,贝切特氏(Bechet或Behcet)病,卡斯尔曼氏(Castleman)综合征,古德帕斯丘氏(Goodpasture)综合征,雷诺氏(Reynaud)综合征,斯耶格伦氏(Sjogren)综合征,史-约二氏(Stevens-Johnson)综合征,类天疱疮诸如大疱性类天疱疮和皮肤类天疱疮,天疱疮(包括寻常型天疱疮、落叶型天疱疮、粘膜类天疱疮型天疱疮和红斑性天疱疮),自身免疫性多内分泌病,莱特氏(Reiter)病或综合征,免疫复合物肾炎,抗体介导的肾炎,慢性神经病诸如IgM多神经病或IgM介导的神经病,血小板减少症(例如心肌梗死患者发生的)包括血栓性血小板减少性紫癜(TTP)和自身免疫或免疫介导的血小板减少症诸如特发性血小板减少性紫癜(ITP)包括慢性或急性ITP,睾丸和卵巢的自身免疫病包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎,原发性甲状腺功能减退症,甲状旁腺功能减退,自身免疫性内分泌病包括甲状腺炎诸如自身免疫性甲状腺炎、桥本氏(Hashimoto)病、慢性甲状腺炎(桥本氏(Hashimoto)甲状腺炎)或亚急性甲状腺炎,自身免疫性甲状腺病,特发性甲状腺功能减退症,格雷夫斯氏(Graves)病,多腺性综合征诸如

自身免疫性多腺体综合征（或多腺性内分泌病综合征），瘤外综合征包括神经学瘤外综合征诸如兰伯特-伊顿（Lambert-Eaton）肌无力综合征或伊顿-兰伯特（Lambert-Eaton）综合征，僵体或僵人综合征，脑脊髓炎诸如变应性脑脊髓炎（allergic encephalomyelitis, encephalomyelitis allergica）和实验性变应性脑脊髓炎（EAE），重症肌无力，小脑变性，神经性肌强直，视性眼阵挛或视性眼阵挛肌阵挛综合征（OMS），和感觉神经病，席汉氏（Sheehan）综合征，自身免疫性肝炎、慢性肝炎、类狼疮肝炎、巨细胞性肝炎、慢性活动性肝炎或自身免疫性慢性活动性肝炎，淋巴样间质性肺炎，梗阻性细支气管炎（非移植）对 NSIP，格-巴二氏（Guillain-Barré）综合征，贝格尔氏（Berger）病（IgA 肾病），特发性 IgA 肾病，线性 IgA 皮肤病，原发性胆汁性肝硬化，肺硬变，自身免疫性肠病综合征，乳糜泻，腹部疾病，口炎性腹泻（麸质肠病），顽固性口炎性腹泻，特发性口炎性腹泻，冷球蛋白血症、肌萎缩侧索硬化（ALS）（卢格里克氏（Lou Gehrig）病），冠状动脉病，自身免疫性内耳病（AIED）或自身免疫性听觉丧失，视性眼阵挛肌阵挛综合征（OMS），多软骨炎诸如顽固性或复发性多软骨炎，肺泡蛋白沉着症，淀粉样变，巩膜炎，非癌性淋巴细胞增多，原发性淋巴细胞增多包括单克隆 B 细胞淋巴细胞增多（例如良性单克隆丙种球蛋白病和性质未确定的单克隆丙种球蛋白病（MGUS）），周围神经病，瘤外综合征，通道病诸如癫痫、偏头痛、心率失常、肌肉病症、失聪、失明、周期性瘫痪和 CNS 的通道病，孤独症，炎性肌病，局灶性节段性肾小球硬化（FSGS），内分泌性眼病，葡萄膜视网膜炎，脉络膜视网膜炎，自身免疫性肝脏病学病症，纤维肌痛，多发性内分泌衰竭，施密特氏（Schmidt）综合征，肾上腺炎，胃萎缩，早老性痴呆，脱髓鞘病诸如自身免疫性脱髓鞘病，糖尿病肾病，德雷斯勒氏（Dressler）综合征，斑秃，CREST 综合征（钙质沉着症、雷诺氏（Raynaud）现象、食道运动功能障碍、指端硬化和毛细血管扩张），男性和女性自身免疫性不孕不育，混合性结缔组织病，恰加斯氏（Chagas）病，风湿热，习惯性流产，农民肺，多形红斑，心脏切开术后综合征，柯兴氏（Cushing）综合征，养鸟者肺，变应性肉芽肿性血管炎，良性淋巴细胞性血管炎，阿尔波特氏（Alport）综合征，肺泡炎诸如变应性肺泡炎和纤维化肺泡炎，间质性肺病，输血反应，麻风，疟疾，利什曼病，锥虫病（kypanosomiasis），血吸虫病，蛔虫病，曲霉病，Sampter 氏综合征，卡普兰氏（Caplan）综合征，登革，心内膜炎，心内膜心肌纤维化，弥漫性肺间质纤维化，间质性肺纤维化，特发性肺纤维化，囊性纤维化，眼内炎，持久隆起性红斑（erythema elevatum et diutinum），胎儿成红细胞增多症，嗜曙红细胞性筋膜炎（faciitis）、舒尔曼氏（Shulman）综合征，费尔提氏（Felty）综合征，flariasis，睫状体炎诸如慢性睫状体炎、异时性睫状体炎、虹膜睫状体炎或 Fuch 氏睫状体炎，亨诺-许兰二氏（Henoch-Schonlein）紫癜，人免疫缺陷病毒（HIV）感染，艾柯病毒感染，心肌病，阿尔茨海默氏（Alzheimer）病，细小病毒感染，风疹病毒感染，种痘后综合征，先天性风疹感染，爱泼斯坦-巴尔（Epstein-Barr）病毒感染、腮腺炎，埃文斯（Evans）综合征，自身免疫性性腺衰竭，西登哈姆氏（Sydenham）舞蹈病，链球菌后肾炎，闭塞性血栓性血管炎（thromboangitis obliterans），甲状腺毒症，脊髓痨，脉络膜炎，巨细胞性多肌痛，内分泌性眼病，慢性超敏感性肺炎，干燥性角膜结膜炎，流行性角膜结膜炎，特发性肾炎综合征，微小病变肾病，良性家族性和缺血-再灌注损伤，视网膜自身免疫，关节炎，支气管炎，慢性阻塞性气道疾病，硅沉着病，口疮，口疮性口炎，动脉硬化性病，无精子发生（aspermogenesis），自身免疫性溶血，伯克氏（Boeck）病，冷球蛋白血症，杜普伊特伦氏（Dupuytren）挛缩，晶体过敏性眼内炎（endophthalmitis）

phacoanaphylactica), 变应性小肠炎 (enteritis allergica), 麻风节结性红斑, 特发性面瘫, 慢性疲乏综合征, 风湿热 (febris rheumatica), 哈 - 里二氏 (Hamman-Rich) 病, 感觉神经性听觉丧失, 阵发性血红蛋白尿 (haemoglobinuria paroxysmatica), 性腺功能减退, 局限性回肠炎 (ileitis regionalis), 白细胞减少症, 传染性单核细胞增多症, 横贯性 (traverse) 脊髓炎, 原发性特发性粘液水肿, 肾病, 交感性眼炎 (ophthalmia sympathica), 肉芽肿性睾丸炎 (orchitis granulomatosa), 胰腺炎, 急性多神经根炎, 坏疽性脓皮症, 奎尔万氏 (Quervain) 甲状腺炎, 获得性脾萎缩, 由于抗精虫抗体的不育症, 非恶性胸腺瘤, 白癜风, SCID 和爱泼斯坦 - 巴尔 (Epstein-Barr) 病毒相关疾病, 获得性免疫缺陷综合征 (AIDS), 寄生虫病诸如利什曼虫, 中毒性休克综合征, 食物中毒, 涉及 T 细胞浸润的疾患, 白细胞粘附缺陷, 与细胞因子和 T- 淋巴细胞介导的急性和迟发性超敏感性有关的免疫应答, 涉及白细胞渗出的疾病, 多器官损伤综合征, 抗原 - 抗体复合物介导的疾病, 抗肾小球基底膜病, 变应性神经炎, 自身免疫性多内分泌病, 卵巢炎, 原发性粘液水肿, 自身免疫性萎缩性胃炎, 交感性眼炎, 风湿病, 混合性结缔组织病, 肾病综合征, 胰岛炎, 多内分泌衰竭, 周围神经病, 自身免疫性多腺性综合征 I 型, 成人期发作的特发性甲状旁腺功能减退 (AOTH), 全秃, 扩张型心肌病, 获得性大疱性表皮松解 (epidermolysis bullosa acquisita, EBA), 血色素沉着, 心肌炎, 肾病综合征, 原发性硬化性胆管炎, 化脓性或非化脓性鼻窦炎, 急性或慢性鼻窦炎, 筛窦炎, 额窦炎, 上颌窦炎或蝶窦炎, 嗜曙红细胞相关病症诸如嗜曙红细胞增多症、肺嗜曙红细胞增多性浸润、嗜曙红细胞增多 - 肌痛综合征、吕弗勒氏 (Loffler) 综合征、慢性嗜曙红细胞性肺炎、热带肺嗜曙红细胞增多、支气管肺曲霉病、曲霉肿、或含有嗜曙红细胞的肉芽肿, 过敏反应, 血清阴性脊椎关节炎病, 多内分泌自身免疫病, 硬化性胆管炎, 巩膜、巩膜外层、慢性粘膜皮肤假丝酵母病, 布鲁顿氏 (Bruton) 综合征, 婴儿期一过性低丙种球蛋白血症, 威斯科特 - 奥尔德里奇 (Wiskott-Aldrich) 综合征, 共济失调性毛细血管扩张, 与以下各项有关的自身免疫性病症: 胶原病、风湿病、神经病学疾病、缺血再灌注紊乱、血压应答降低 (reduction in blood pressure response)、血管功能障碍、毛细血管扩张 (angiectasis)、组织损伤、心血管缺血、痛觉过敏、脑缺血和伴随血管化的疾病, 变应性超敏感性病症, 肾小球肾炎病, 再灌注损伤, 心肌或其它组织的再灌注损伤, 具有急性炎性成分的皮肤病, 急性化脓性脑膜炎或其它中枢神经系统炎性病症, 粒细胞输血相关综合征, 细胞因子诱发的中毒, 急性重度炎症, 慢性顽固性炎症, 肾盂炎, 肺硬变, 糖尿病性视网膜病, 糖尿病性大动脉病症, 动脉内增生, 消化性溃疡, 心瓣炎, 和子宫内膜异位症。

[0151] 癌症治疗可以通过例如但不限于肿瘤消退、肿瘤体积或大小收缩、距进展的时间、存活持续时间、无进展存活、整体响应率、响应持续时间、生活质量、蛋白质表达和 / 或活性来评估。因为本文所述抗血管发生剂靶向肿瘤血管结构而不必是赘生性细胞本身, 所以它们代表了一类独特的抗癌药, 并因此可以要求独特的对药物的临床应答的测量和定义。例如, 二维分析中大于 50% 的肿瘤收缩是宣告响应的标准截留。然而, 本发明的 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂可以引起对转移性扩散的抑制而没有原发瘤的收缩, 或者可以仅仅发挥抑制肿瘤效果。因而, 可采用测定治疗功效的方法, 包括例如测量血管发生的血浆或尿液标志物和通过放射学成像测量响应。

[0152] 取决于待治疗的适应症和本领域熟练医师所熟悉的与剂量给药有关的因素, 以有效治疗该适应症同时最小化毒性和副作用的剂量施用本发明的抗体。为了治疗癌症、自身

免疫病或免疫缺陷病,治疗有效量可以在例如 50mg/剂到 2.5g/m² 的范围内。在一个实施方案中,所施用的剂量是大约 250mg/m² 到大约 400mg/m² 或 500mg/m²。在另一个实施方案中,剂量是大约 250-375mg/m²。在又一个实施方案中,剂量范围是 275-375mg/m²。

[0153] 年龄相关黄斑变性 (AMD) 的治疗可以通过但不限于进一步视力丧失比率/速率的降低或进一步视力丧失的预防来评估。对于 AMD 疗法,体内功效可以通过例如下述一项或多项来测量:评估最好矫正视力 (BCVA) 自基线到期望时间的均值变化;评估在期望时间与基线相比视力损失小于 15 个字母的受试者比例;评估在期望时间与基线相比视力获得超过或等于 15 个字母的受试者比例;评估在预期时间 Snellen 视力相当于 20/2000 或更差的受试者比例;评估 NEI 视觉功能问卷 (Visual Functioning Questionnaire);评估预期时间 CNV 的大小和 CNV 渗漏的量,通过荧光素血管造影术评估;等。

[0154] 术语“检测”意图包括测定物质的存在与否或对物质的量定量。该术语如此指将本发明的材料、组合物、和方法用于定量和定性测定。一般而言,用于检测的具体技术对于本发明的实施不是至关重要的。

[0155] 例如,依照本发明的“检测”可以包括:观察 $\alpha 5$ 基因产物、mRNA 分子、或 $\alpha 5$ 多肽的存在与否; $\alpha 5$ 多肽水平或结合至靶物的量的变化; $\alpha 5$ 多肽的生物学功能/活性的变化。在一些实施方案中,“检测”可以包括检测野生型 $\alpha 5$ 水平(例如 mRNA 或多肽水平)。检测可以包括对与对照相比介于 10%和 90%之间任何数值、或介于 30%和 60%之间任何数值、或超过 100%的变化(升高或降低)的定量。检测可以包括对介于 2 倍和 10 倍之间(含两端值)任何数值或更大(例如 100 倍)的变化的定量。

[0156] 术语“标记物”在用于本文时指与抗体直接或间接偶联的可检测化合物或组合物。标记物自身可以通过自身就可检测的(例如放射性同位素标记物或荧光标记物),或者在酶标记物的情况中,可催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。

[0157] 新的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体

[0158] 本文中提供了能结合人 $\alpha 5 \beta 1$ 并竞争性抑制抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体结合人 $\alpha 5 \beta 1$ 的新抗体。依照一个实施方案,所述抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体是由选自下组的杂交瘤生成的:2006 年 3 月 7 日在 ATCC 作为 $\alpha 5/\beta 1$ 7H5.4.2.8(ATCC No. PTA-7421) 保藏的杂交瘤和作为 $\alpha 5/\beta 1$ 7H12.5.1.4(ATCC No. PTA-7420) 保藏的杂交瘤。依照另一个实施方案,所述抗体是由选自下组的杂交瘤生成的:2006 年 3 月 7 日在 ATCC 作为 $\alpha 5/\beta 1$ 7H5.4.2.8(ATCC No. PTA-7421) 保藏的杂交瘤和作为 $\alpha 5/\beta 1$ 7H12.5.1.4(ATCC No. PTA-7420) 保藏的杂交瘤。依照又一个实施方案,所述抗体包含由 2006 年 3 月 7 日在 ATCC 作为 $\alpha 5/\beta 1$ 7H5.4.2.8(ATCC No. PTA-7421) 保藏的杂交瘤生成的抗体的重链可变域 (VH) 和轻链可变域 (VL) 序列。在另一个实施方案中,所述抗体包含由 2006 年 3 月 7 日在 ATCC 作为 $\alpha 5/\beta 1$ 7H12.5.1.4(ATCC No. PTA-7420) 保藏的杂交瘤生成的抗体的重链可变域 (VH) 和轻链可变域 (VL) 序列。还涵盖所保藏杂交瘤的抗体的人抗体或嵌合抗体形式。

[0159] 依照一个实施方案,所述抗体能以介于 500nM 和 1pM 之间的 Kd 结合人 $\alpha 5 \beta 1$ 。依照另一个实施方案,所述抗体不能结合 $\alpha V \beta 3$ 或 $\alpha V \beta 5$ 或 $\alpha V \beta 1$ 。依照另一个实施方案,所述抗体包含人 IgG,例如人 IgG1 或人 IgG4 的 Fc 序列。在另一个实施方案中,Fc 序列已经改变或者有其它方式变化,使得它缺乏抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 效应器功能,这常常与它们对 Fc 受体 (FcR) 的结合有关。可改变效应器功能的 Fc 序列变化或突变有许多

例子。例如, W000/42072 (Presta) 和 Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2) :6591-6604 (2001) 记载了具有提高的或降低的 FcR 结合的抗体变体。将这些出版物的内容明确收入本文作为参考。所述抗体可以是 Fab、Fab'、F(ab)'₂、单链 Fv (scFv)、Fv 片段; 双抗体和线性抗体的形式。同样, 所述抗体可以是能结合 $\alpha 5 \beta 1$ 的多特异性抗体, 而且是 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂, 但是还能结合一种或多种其它靶物并抑制其功能 (例如 VEGF)。所述抗体可以偶联至治疗剂 (例如细胞毒剂、放射性同位素和化疗剂) 或标记物, 后者用于检测患者样品中的 $\alpha 5 \beta 1$ 或者通过成像用于检测体内 $\alpha 5 \beta 1$ (例如放射性同位素、荧光染料和酶)。

[0160] 还涵盖编码抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的核酸分子、包含编码两种可变域之一或二者的核酸分子的表达载体、及包含所述核酸分子的细胞。这些抗体可用于本文所述疗法和用于检测患者样品中的 (例如 FACS、免疫组化 (IHC)、ELISA 测定法) 或患者中的 $\alpha 5 \beta 1$ 蛋白。

[0161] 新的组合物

[0162] 本文中提供了用于抑制患有疾病的受试者中的血管发生和 / 或血管通透性的新组合物, 该组合物包括 VEGF 拮抗剂和 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂。所述 VEGF 拮抗剂和所述 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂在治疗循环中可以同时或顺次施用。此类联合疗法对于治疗疾病是有用的, 包括那些具有异常血管发生和 / 或血管通透性且将会受益于抗血管发生疗法的疾病。此类疾病包括但不限于癌症、眼病、和自身免疫病。或者, 受试者可以用所述 VEGF 拮抗剂治疗, 随后施用所述 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂, 例如用 VEGF 拮抗剂治疗, 直至受试者对 VEGF 拮抗剂治疗没有响应, 然后受试者用 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂治疗。依照一个实施方案, 受试者在癌是非侵入性的时候用 VEGF 拮抗剂治疗, 而在癌是侵入性的时候用 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂治疗。有些与无病患者或对照相比天然经历升高的 $\alpha 5 \beta 1$ 水平或者响应 VEGF 拮抗剂疗法而经历升高的 $\alpha 5 \beta 1$ 水平的患者可以是尤其对此联合疗法有响应的。涵盖进一步包括治疗剂 (例如抗肿瘤剂、化疗剂、生长抑制剂和细胞毒剂) 的组合物。例如, 有待用化疗 (例如伊立替康) 和 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂治疗的患者或已经用化疗和 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂治疗过的患者可受益于 VEGF 拮抗剂疗法。或者, 已经用化疗和 VEGF 拮抗剂治疗过的患者可受益于 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂疗法。在一个优选的实施方案中, 所述抗 VEGF 抗体是 **Avastin®** 抗体。在另一个优选的实施方案中, 所述抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体是本文所述抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体。涵盖包含 VEGF 拮抗剂、 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂和任选的化疗剂的试剂盒。

[0163] 药用配制剂

[0164] 依照本发明使用的抗体的治疗用配制剂通过将具有期望纯度的抗体与任选的药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A. 编 (1980)) 混合, 以冻干配制剂或水溶液的形式制备, 共贮存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的, 包括缓冲剂, 诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 防腐剂 (诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵; 氯化己烷双胺; 苯扎氯铵、苯索氯铵; 酚、丁醇或苯甲醇; 对羟基苯甲酸烷基酯, 诸如对羟基苯甲酸的甲酯或丙酯; 邻苯二酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 和间甲酚); 低分子量 (少于约 10 个残基) 多肽; 蛋白质, 诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物, 诸如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸, 诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸; 单糖、二糖和其它碳水化合物, 包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合剂, 诸如 EDTA; 糖类, 诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇; 成盐反荷离子, 诸如钠; 金属复合物 (例如 Zn-蛋白质复合

物);和 / 或非离子表面活性剂,诸如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG)。例示性的抗体配制剂记载于 WO 98/56418,在此明确收入作为参考。适于皮下施用的冻干配制剂记载于 WO 97/04801。此类冻干配制剂可用合适的稀释剂重建至高蛋白质浓度,重建的配制剂可皮下施用于本文中待治疗的哺乳动物。

[0165] 本文中的配制剂还可含有超过一种所治疗具体适应症所必需的活性化合物,优选那些活性互补且彼此没有不利影响的化合物。例如,可能希望进一步提供细胞毒剂、化疗剂、细胞因子或免疫抑制剂(例如作用于 T 细胞的免疫抑制剂,诸如环孢霉素或结合 T 细胞的抗体,例如结合 LFA-1 的抗体)。此类其它药剂的有效量取决于配制剂中存在的抗体的量、疾病或病症或治疗的类型、及上文讨论的其它因素。这些通常是以与本文所述相同的剂量,以本文所述施用路径而使用的,或是迄今所采用的剂量的大约 1-99%。

[0166] 活性成分还可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中(例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊),在胶状药物投递系统中(例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊),或在粗滴乳状液中。此类技术披露于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences,第 16 版,Osol, A. 编(1980)。

[0167] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有拮抗剂的固体疏水性聚合物半透性基质,该基质是定型产品的形式,例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利 No. 3,773,919)、L-谷氨酸和 L-谷氨酸乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如 LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体)及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0168] 用于体内施用的配制剂必须是无菌的。这可容易的通过使用无菌滤膜过滤来实现。

[0169] 制品和试剂盒

[0170] 本发明的另一个实施方案是包含可用于治疗肿瘤、眼病或自身免疫病和相关疾患的物质的制品。所述制品可以包括容器及容器上或与容器相关的标签或包装插页。合适的容器包括例如药瓶、药管、注射器等。所述容器可以用多种材料制成,诸如玻璃或塑料。一般而言,所述容器装有有效治疗所述疾患的组合物,可以具有无菌存取口(例如所述容器可以是静脉内溶液袋或带有皮下注射针可刺穿的塞子的药瓶)。所述组合物中的至少一种活性药剂是本发明的 VEGF 拮抗剂或 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂或 VEGFR 激动剂或 $\alpha 5 \beta 1$ 激动剂。所述标签或包装插页指明该组合物用于治疗所述具体疾患。所述标签或包装插页进一步包含关于对患者施用所述抗体组合物的说明书。还涵盖包含本文所述联合疗法的制品和试剂盒。

[0171] 包装插页指通常包括在治疗用产品商品化包装中的说明书,它包含有关此类治疗用产品使用的适应症、用法、剂量、施用、禁忌和 / 或警告的信息。在一个实施方案中,包装插页指明该组合物用于治疗非何杰金氏淋巴瘤。

[0172] 另外,所述制品可进一步包括第二容器,其中装有药学可接受缓冲液,诸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏(Ringer)溶液和右旋糖溶液。它可进一步包括从商业和用户立场出发需要的其它物质,包括其它缓冲液、稀释剂、滤器、针和注射器。

[0173] 还提供了可用于各种目的的试剂盒,例如用于分离或检测患者中的 $\alpha 5 \beta 1$ 和 / 或 VEGF,任选联合所述制品。为了分离和纯化 $\alpha 5 \beta 1$,所述试剂盒可包含与珠子(例如

sepharose 珠子) 偶联的抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体。可提供包含用于 $\alpha 5 \beta 1$ 和 / 或 VEGF 体外检测和定量的抗体, 例如在 ELISA 或 Western 印迹中进行的。与制品一样, 所述试剂盒包括容器及容器上或与容器相关的标签或包装插页。例如, 所述容器装有包含至少一种本发明抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的组合物。可包括装有例如稀释剂和缓冲液、对照抗体的别的容器。所述标签或包装插页可提供该组合物的描述以及意图体外或诊断使用的说明书。

[0174] 单克隆抗体

[0175] 单克隆抗体可使用例如杂交瘤方法来制备, 诸如那些由 Kohler and Milstein, *Nature*, 256 :495 (1975) 记载的, 或者可以通过重组 DNA 方法 (美国专利 No. 4, 816, 567) 来制备, 或者可以通过本文实施例部分所述的方法来生成。在杂交瘤方法中, 通常用免疫剂免疫小鼠、仓鼠、或其它适宜的宿主动物以引发生成或能够生成如下抗体的淋巴细胞, 所述抗体将特异性结合所述免疫剂。或者, 可以在体外免疫淋巴细胞。

[0176] 免疫剂通常包括感兴趣蛋白质的多肽或融合蛋白或者包含该蛋白质的组合物。一般而言, 若想要人起源的细胞, 则使用外周血淋巴细胞 (PBL); 或者, 若想要非人哺乳动物来源, 则使用脾细胞或淋巴结细胞。然后, 使用合适的融合剂诸如聚乙二醇将淋巴细胞与永生化细胞系融合, 以形成杂交瘤细胞 (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, New Yourk, Academic Press, 1986, pp. 59-103)。永生化细胞系通常是经转化的哺乳动物细胞, 特别是啮齿类、牛、和人起源的骨髓瘤细胞。通常, 采用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。杂交瘤细胞可以在合适的培养基中培养, 所述培养基优选含有抑制未融合的永生化细胞生长或存活的一种或多种物质。例如, 若亲本细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HPRT), 则用于杂交瘤的培养基典型的将含有次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷 (HAT 培养基), 这些物质阻止 HGPRT 缺陷细胞生长。

[0177] 优选的永生化细胞系是那些高效融合、支持所选抗体生成细胞稳定的高水平表达抗体、并对诸如 HAT 培养基的培养基敏感的。更优选的永生化细胞系是鼠骨髓瘤系, 其可以从例如索尔克研究所细胞分配中心 (Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA) 和美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA) 获得。人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也已记载用于生成单克隆抗体 (Kozbor, *J. Immunol.* 133 :3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, pp. 51-63)。

[0178] 然后可以对杂交瘤细胞正在其中培养的培养液测定针对多肽的单克隆抗体的存在。可以通过免疫沉淀或通过体外结合测定法, 诸如放射免疫测定法 (RIA) 或酶联免疫吸附测定法 (ELISA), 测定由杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。此类技术和测定法是本领域已知的。单克隆抗体的结合亲和力可通过例如 Munson and Pollard, *Anal. Biochem.* 107 :220 (1980) 的 Scatchard 分析来测定。

[0179] 在鉴定出想要的杂交瘤细胞后, 该克隆可通过有限稀释规程进行亚克隆并通过标准方法进行培养 (Goding, 见上文)。适于这一目的的培养基包括例如 Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基和 RPMI-1640 培养基。或者, 杂交瘤细胞可以在哺乳动物中作为腹水进行体内培养。

[0180] 可通过常规免疫球蛋白纯化规程, 诸如例如蛋白 A-Sepharose、羟磷灰石层析、凝

胶电泳、透析或亲和层析，自培养液或腹水分离或纯化亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0181] 单克隆抗体还可以通过重组 DNA 方法来制备，诸如美国专利 No. 4, 816, 567 中所记载的。编码本发明单克隆抗体的 DNA 可以容易的使用常规规程分离和测序（例如通过使用能够特异性结合编码鼠抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针）。以本发明的杂交瘤细胞作为此类 DNA 的优选来源。一旦分离，可将 DNA 置于表达载体中，然后将该表达载体转染到原本不生成免疫球蛋白蛋白质的宿主细胞中，诸如猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞，以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。还可以修饰 DNA，例如通过替代即用人重链和轻链恒定域的编码序列代替同源鼠序列（美国专利 No. 4, 816, 567；Morrison et al., 见上文），或通过将非免疫球蛋白多肽的整个或部分编码序列与免疫球蛋白编码序列共价连接。可以用此类非免疫球蛋白多肽替代本发明抗体的恒定域，或者可以用它们替代本发明抗体的一个抗原结合位点的可变域，以创建嵌合二价抗体。

[0182] 所述抗体可以是单价抗体。用于制备单价抗体的方法是本领域已知的。例如，一种方法牵涉重组表达免疫球蛋白轻链和经修饰的重链。所述重链一般在 Fc 区中任何位点处截短以防止重链交联。或者，将相关半胱氨酸残基用另一种氨基酸残基替代或者删除以防止交联。

[0183] 体外方法也适用于制备单价抗体。消化抗体以生成其片段，特别是 Fab 片段，可以使用但不限于本领域已知技术来实现。

[0184] 人抗体和人源化抗体

[0185] 抗体可以是人源化抗体或人抗体。非人（例如鼠）抗体的人源化形式指通常最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段（诸如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或抗体的其它抗原结合子序列）。人源化抗体包括人免疫球蛋白（受体抗体）中的 CDR 残基用具有期望特异性、亲和力和能力的非人物种（供体抗体）诸如小鼠、大鼠或家兔的 CDR 残基替换的抗体。在有些情况中，将人免疫球蛋白的 Fv 框架残基用相应的非人残基替换。人源化抗体还可包含在受体抗体和输入 CDR 或框架序列中都没有发现的残基。通常，人源化抗体可以包含至少一个、通常两个基本上整个如下的可变域，其中所有或基本上所有 CDR 对应于非人免疫球蛋白的 CDR，且所有或基本上所有 FR 是人免疫球蛋白共有序列的 FR。人源化抗体优选还将包含至少部分免疫球蛋白恒定区 (Fc)，通常是人免疫球蛋白的恒定区 (Jones et al., Nature 321 :522-525(1986) ;Riechmann et al., Nature 332 :323-329(1988) ;Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2 :593-596(1992))。

[0186] 用于人源化非人抗体的一些方法在本领域和下文实施例中有描述。通常，人源化抗体中引入了一个或多个来自非人来源的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称作“输入”残基，它们通常取自“输入”可变域。依照一个实施方案，人源化可基本上遵循 Winter 及其同事的方法进行 (Jones et al., Nature 321 :522-525(1986) ;Riechmann et al., Nature 332 :323-327(1988) ;Verhoeyen et al., Science 239 :1534-1536(1988))，即用啮齿类 CDR 或 CDR 序列替代人抗体的相应序列。因此，此类“人源化”抗体是这样的抗体（美国专利 No. 4, 816, 567），其中基本上少于整个人可变域用来自非人物种的相应序列替代。在实践中，人源化抗体通常是其中一些 CDR 残基和可能的一些 FR 残基用来自啮齿类抗体中类似位点的残基替代的人抗体。

[0187] 作为人源化的替代方法，可生成成人抗体。例如，现在有可能生成这样的转基因动

物(例如小鼠),它们在缺乏内源性免疫球蛋白生成的情况下能够在免疫后生成成人抗体完整全集。例如,已经记载了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合删除导致内源性抗体生成的完全抑制。将大量人种系免疫球蛋白基因转移到此类种系突变小鼠中将导致在抗原攻击后生成成人抗体。参见例如 Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551(1993); Jakobovits et al., Nature 362:255-258(1993); Bruggemann et al., Year in Immuno. 7:33(1993); 美国专利 No. 5,545,806, 5,569,825, 5,591,669(都属于 GenPharm); 5,545,807; WO 97/17852。或者,可以如下生成成人抗体,即将人免疫球蛋白基因座导入转基因动物,例如内源免疫球蛋白基因已经部分或完全灭活的小鼠。在攻击时,观察到人抗体的生成在所有方面与在人中看到的密切相似,包括基因重排、装配、和抗体全集。这种方法记载于例如美国专利 No. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 和 5,661,016, 及下列科学出版物: Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783(1992); Lonberg et al., Nature, 368:856-859(1994); Morrison, Nature, 368:812-813(1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology, 14:845-851(1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14:826(1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13:65-93(1995)。

[0188] 或者,噬菌体展示技术(McCafferty et al., Nature 348:552-553(1990))可用于在体外从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变域(V)基因全集生成成人抗体和抗体片段。依照这种技术的一个实施方案,将抗体可变域序列以符合读码框的方式克隆到丝状噬菌体诸如 M13 或 fd 的主要或次要外壳蛋白基因中,并在噬菌体颗粒表面上展示为功能性抗体片段。噬菌体展示可以以多种形式进行,例如下文实施例部分所述,或者综述参见例如 Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)。V 基因区段的数种来源可用于噬菌体展示。Clackson et al., Nature 352:624-628(1991) 从衍生自经免疫小鼠脾的小型 V 基因随机组合文库中分离出大量不同的抗噁唑酮抗体。可基本上遵循 Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597(1991) 或 Griffith et al., EMBO J. 12:725-734(1993) 所记载的技术,由未免疫人供体构建 V 基因全集和分离针对大量不同抗原(包括自身抗原)的抗体。还可参见美国专利 No. 5,565,332 和 5,573,905。

[0189] 如上所述,还可通过体外激活 B 细胞来生成成人抗体(参见美国专利 No. 5,567,610 和 5,229,275)。

[0190] 人抗体还可以使用本领域已知的多种技术来生产,包括噬菌体展示库(Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381(1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581(1991))。Cole 等人和 Boerner 等人的技术也可用于制备人单克隆抗体(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77(1985) 和 Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95(1991))。

[0191] 多特异性抗体

[0192] 多特异性抗体指对两种或更多种不同抗原具有结合特异性的单克隆抗体,优选人抗体或人源化抗体(例如,双特异性抗体对至少两种抗原具有结合特异性)。例如,结合特异性之一可以是针对 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体,结合特异性之另一可以是针对任何其它抗原。依照一个优选的实施方案,另一抗原是细胞表面蛋白或受体或受体亚基。例如,所述细胞表面蛋白可以是天然杀伤(NK)细胞受体。如此,依照一个实施方案,本发明的双特异性抗体可结合

$\alpha 5 \beta 1$ 和结合 VEGF。

[0193] 用于构建双特异性抗体的方法的例子已有描述。传统的是,双特异性抗体的重组生产基于两对免疫球蛋白重链/轻链的共表达,其中两种重链具有不同的特异性(Millstein and Cuello, Nature 305 :537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四源杂交瘤(quadroma))生成 10 种不同抗体分子的潜在混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤来进行正确分子的纯化。类似的规程披露于 1993 年 5 月 13 日公布的 WO 93/08829 及 Traunecker et al., EMBO J. 10 : 3655-3659(1991)。

[0194] 可以将具有期望结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变域与免疫球蛋白恒定域序列融合。优选的是,与包含至少部分铰链、CH2 和 CH3 区的免疫球蛋白重链恒定域进行融合。优选的是,在至少一种融合物中存在包含轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区(CH1)。将编码免疫球蛋白重链融合物和,在需要时,免疫球蛋白轻链的 DNA 插入分开的表达载体,并共转染到合适的宿主生物体中。关于生成双特异性抗体的进一步详情参见例如 Suresh et al., Methods in Enzymology 121 :210(1986)。

[0195] 还记载了从重组细胞培养物直接生成和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如,已使用亮氨酸拉链生成双特异性抗体。Kostelny et al., J. Immunol. 148(5) : 1547-1553(1992)。将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两种不同抗体的 Fab' 部分连接。抗体同二聚体在铰链区还原以形成单体,然后重新氧化以形成抗体异二聚体。这种方法也可用于生成抗体同二聚体。Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6444-6448(1993) 记载的“双抗体”技术提供了构建双特异性抗体片段的替代机制。该片段包含通过接头相连的 VH 和 VL,所述接头太短使得同一条链上的两个结构域之间不能配对。因此,迫使一个片段上的 VH 和 VL 结构域与另一个片段上的互补 VL 和 VH 结构域配对,由此形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链 Fv(sFv) 二聚体构建双特异性抗体片段的另一种策略。参见 Gruber et al., J. Immunol. 152 :5368(1994)。

[0196] 设想了具有超过两个效价的抗体。例如,可制备三特异性抗体。Tutt et al., J. Immunol. 147 :60(1991)。

[0197] 异源偶联抗体

[0198] 异源偶联抗体由两种共价连接的抗体构成。此类抗体建议用于例如将免疫系统细胞靶向不想要的细胞(美国专利 No. 4, 676, 980) 及用于治疗 HIV 感染(WO 91/00360 ;WO 92/200373 ;EP 03089)。设想了可在体外使用合成蛋白质化学的已知方法制备抗体,包括那些涉及交联剂的方法。例如,可使用二硫化物交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。适于此目的的试剂的例子包括亚氨基硫醇酯/盐(iminothiolate) 和 4-巯基丁酰亚氨酸甲酯(methyl-4-mercaptobutyrimidate) 及例如美国专利 No. 4, 676, 980 中所公开的。

[0199] 效应器功能工程改造

[0200] 可能希望在效应器功能方面修饰本发明的抗体,从而增强例如抗体在治疗癌症中的效力。例如,可向 Fc 区中引入半胱氨酸残基,从而使得在该区中形成链间二硫键。如此生成的同二聚体抗体可具有改善的内在化能力和/或提高的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞细胞毒性(ADCC)。参见 Caron et al., J. Exp. Med. 176 :1191-1195(1992) 和 Shopes, J. Immunol. 148 :2918-2922(1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体还可使

用如 Wolff et al., *Cancer Research* 53 :2560-2565 (1993) 中描述的异双功能交联剂来制备。或者, 抗体可改造成具有双重 Fc 区, 由此可具有增强的补体溶解和 ADCC 能力。参见 Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design* 3 :219-230 (1989)。

[0201] 可以进行 Fc 区序列中的突变或改变以改进 FcR 结合 (例如 FcγR、FcRn)。依照一个实施方案, 本发明的抗体具有至少一项改变的选自下组的效应器功能: ADCC、CDC、和改进的 FcRn 结合, 与天然 IgG 或亲本抗体相比。数种有用的特定突变的例子记载于例如 Shields, RL et al. (2001) *JBC* 276 (6) :6591-6604 ; Presta, L. G., (2002) *Biochemical Society Transactions* 30 (4) :487-490 ; WO 出版物 W000/42072。

[0202] 依照一个实施方案, Fc 受体突变是选自下组的至少一个位置的替代: Fc 区的 238、239、246、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、332、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 或 439, 其中 Fc 区的残基编号方式依照 EU 编号系统。

[0203] 免疫偶联物

[0204] 本发明还关于包含偶联有细胞毒剂的抗体的免疫偶联物, 所述细胞毒剂诸如化疗剂、毒素 (如细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素或其片段) 或放射性同位素 (即放射偶联物)。

[0205] 上文已经描述了可用于生成此类免疫偶联物的化疗剂。可使用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链 (来自铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*)、蓖麻毒蛋白 (ricin) A 链、相思豆毒蛋白 (abrin) A 链、蒴莲根毒蛋白 (modeccin) A 链、α-帚曲霉素 (sarcin)、油桐 (*Aleutites fordii*) 毒蛋白、香石竹 (*dianthin*) 毒蛋白、美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 毒蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制物、麻疯树毒蛋白 (curcin)、巴豆毒蛋白 (crotonin)、肥皂草 (*sapaonaria officinalis*) 抑制物、白树毒蛋白 (gelonin)、丝林霉素 (mitogellin)、局限曲菌素 (restrictocin)、酚霉素 (phenomycin)、依诺霉素 (enomycin) 和单端孢菌素 (trichothecenes)。多种放射性核素可用于生成放射偶联抗体。例子包括 ²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y 和 ¹⁸⁶Re。

[0206] 抗体和细胞毒剂的偶联物可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备, 诸如 N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯 (SPDP)、亚氨基硫烷 (IT)、亚氨酸酯 (诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类 (诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类 (诸如戊二醛)、双叠氮化合物 (诸如双 (对-叠氮苯甲酰基) 己二胺)、双重氮衍生物 (诸如双 (对-重氮苯甲酰基) 乙二胺)、二异氰酸酯 (诸如甲苯 2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物 (诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯) 的双功能衍生物。例如, 可如 Vitetta et al., *Science* 238 : 1098 (1987) 中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14 标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂。参见 WO 94/11026。

[0207] 在另一个实施方案中, 可将抗体与“受体” (诸如链霉亲和素) 偶联从而用于肿瘤预先靶向, 其中对患者施用抗体-受体偶联物, 接着使用清除剂由循环中清除未结合的偶

联物,然后施用与细胞毒剂(如放射性核苷酸)偶联的“配体”(如亲合素)。

[0208] 免疫脂质体

[0209] 本文中所公开的抗体还可配制成免疫脂质体。含有抗体的脂质体可通过本领域已知方法来制备,诸如 Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :3688(1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :4030(1980); 美国专利 No. 4,485,045 和 4,544,545。循环时间延长的脂质体披露于美国专利 No. 5,013,556。

[0210] 可用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂类组合物通过反相蒸发法生成特别有用的脂质体。将脂质体挤过具有设定孔径的滤器,产生具有期望直径的脂质体。可如 Martin et al., J. Biol. Chem. 257 :286-288(1982) 中所述,将本发明抗体的 Fab' 片段经二硫化物交换反应与脂质体偶联。任选在脂质体中包含化疗剂(诸如多柔比星(Doxorubicin))。参见 Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19) :1484(1989)。

[0211] 抗体和多肽的药用组合物

[0212] 本文所鉴定的特异性结合多肽的抗体以及通过上文公开的筛选测定法鉴定的其它分子,可以以药用组合物的形式施用以治疗上文和下文所述各种病症。

[0213] 脂转染剂(lipofectin)或脂质体也可用于将本发明的多肽和抗体或组合物投递到细胞中。在使用抗体片段时,优选特异性结合靶蛋白质的结合结构域的最小抑制性片段。例如,基于抗体的可变区序列,可设计保留结合靶蛋白质序列的能力的肽分子。此类肽可以化学合成和/或通过重组 DNA 技术生成(参见例如 Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :7889-7893(1993))。

[0214] 本文中的配制剂还可含有所治疗具体适应症所必需的超过一种活性化合物,优选活性互补且彼此没有不利影响的。或者/另外,组合物还可包含增强其功能的药剂,诸如例如细胞毒剂、化疗剂或生长抑制剂。合适的是,此类分子以对于预定目的有效的量组合存在。

[0215] 活性成分还可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中(例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、在胶状药物投递系统中(例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)、或在粗滴乳状液中。此类技术公开于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 见上文。

[0216] 用于体内施用的配制剂必须是无菌的。这可容易的通过使用无菌滤膜过滤来实现。

[0217] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物半透性基质,该基质是定型产品的形式,例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利 3,773,919)、L-谷氨酸和 L-谷氨酸 γ -乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如 LUPRONDEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体)及聚-D(-)-3-羟基丁酸。虽然诸如乙烯-乙酸乙烯和乳酸-乙醇酸等聚合物能够释放分子达 100 天以上,但是某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。当胶囊化抗体在体内长时间维持时,它们可能由于暴露于 37°C 的潮湿环境而变性或聚集,导致生物学活性损失和免疫原性可能改变。可以根据相关机制来设计合理的稳定化策略。例如,如果

发现聚集机制是经由硫醇-二硫化物互换的分子间 S-S 键形成,那么可通过修饰巯基残基、由酸性溶液冻干、控制湿度、采用适宜添加剂和开发特定聚合物基质组合物来实现稳定。

[0218] 诊断用途和成像

[0219] 经标记的特异性结合多肽的抗体及其衍生物和类似物可用于诊断目的,以检测、诊断、或监测与本发明多肽的表达、异常表达和 / 或活性有关的疾病和 / 或病症。依照一个优选的实施方案,本发明的抗体可用于诊断测定法或成像测定法,其牵涉将抗体注射入受试者。本发明提供了 VEGF 或 $\alpha 5 \beta 1$ 多肽异常表达的检测,包括 (a) 使用一种或多种本发明抗体测定个体的细胞(例如组织)或体液中多肽的表达,并 (b) 将基因表达水平与标准基因表达水平进行比较,由此所测定基因表达水平与标准表达水平相比的升高或降低指示异常表达。

[0220] 本发明的抗体还用于测定生物学样品中的蛋白质水平,其中使用本领域技术人员知道的经典免疫组织学方法(参见例如 Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101: 976-985(1985); Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 105: 3087-3096(1987))。可用于检测蛋白质基因表达的其它基于抗体的方法包括免疫测定法,诸如酶联免疫吸附测定法(ELISA)和放射免疫测定法(RIA)。合适的抗体测定法标记物是本领域知道的,包括酶标记物,诸如葡萄糖氧化酶;放射性同位素,诸如碘(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氡(^3H)、铟($^{115\text{m}}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、锝($^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$)、钛(^{201}Ti)、镓(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、钯(^{103}Pd)、钼($^{99\text{m}}\text{Mo}$)、氙(^{133}Xe)、氟(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru ; 鲁米诺; 荧光标记物,诸如荧光素和罗丹明; 及生物素。

[0221] 本领域已知的技术可应用于标记本发明的抗体。此类技术包括但不限于使用双功能偶联剂(参见例如美国专利 No. 5, 756, 065; 5, 714, 631; 5, 696, 239; 5, 652, 361; 5, 505, 931; 5, 489, 425; 5, 435, 990; 5, 428, 139; 5, 342, 604; 5, 274, 119; 4, 994, 560; 5, 808, 003, 将每一篇的内容完整收入本文作为参考)。

[0222] 动物(优选哺乳动物,最优选人)中与 VEGF 和 / 或 $\alpha 5 \beta 1$ 表达或异常表达有关的疾病或病症的诊断可包括检测哺乳动物中的 $\alpha 5 \beta 1$ 和 / 或 VEGF 分子的步骤。在一个实施方案中,在施用 VEGF 拮抗剂后,诊断包括:(a) 对哺乳动物施用(例如胃肠外、皮下、或腹膜内)有效量的经标记抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体,(b) 在施用后等待一段时间,容许经标记分子优先在受试者中 $\alpha 5 \beta 1$ 分子表达的部位集中(及未结合的经标记分子清除至背景水平);(c) 测定背景水平;并 (d) 检测受试者中的经标记分子,其中检测到经标记分子高于背景水平指示受试者患有与 $\alpha 5 \beta 1$ 表达或异常表达有关的特定疾病或病症。背景水平可以通过多种方法来测定,包括将检测到的经标记分子的数量与事先为特定系统测定的标准曲线比较。

[0223] 依照一个具体的实施方案, $\alpha 5 \beta 1$ 多肽表达或过表达是在施用 VEGF 拮抗剂治疗剂后的诊断或预后测定法中测定的,即评估在细胞表面上存在的 $\alpha 5 \beta 1$ 水平(例如经免疫组化测定法,使用抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体)。或者 / 另外,可以测量细胞中编码 $\alpha 5 \beta 1$ 多肽的核酸或 mRNA 的水平,例如经荧光原位杂交,使用基于核酸的探针,其对应于编码 $\alpha 5 \beta 1$ 的核酸或其互补序列(FISH; 参见 W098/45479, 公布于 1998 年 10 月)、Southern 印迹、Northern 印迹、或聚合酶链式反应(PCR)技术,诸如实时定量 PCR(RT-PCR)。还可以通过测量生物学流体诸如血清中的脱落抗原来研究 $\alpha 5 \beta 1$ 过表达,例如使用基于抗体的测定法(还可参见例如美国专利 No. 4, 933, 294, 公告于 1990 年 6 月 12 日; W091/05264, 公布于 1991 年 4 月 18

日；美国专利 No. 5, 401, 638, 公告于 1995 年 3 月 28 日；及 Sias et al., J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990)。在上述测定法以外, 多种体内测定法可供熟练从业人员使用。例如, 可以将哺乳动物身体内的细胞暴露于抗体, 其任选用可检测标记物标记, 例如放射性同位素, 并可以评估抗体对哺乳动物中细胞的结合, 例如通过外部扫描放射性或通过分析取自先前暴露于抗体的哺乳动物的活检。

[0224] 将本文中所引用的所有出版物(包括专利和专利申请)完整收入本文作为参考, 具体包括 2006 年 3 月 21 日提交的美国临时申请 No. 60/784, 704; 2006 年 3 月 22 日提交的美国临时申请 No. 60/785, 330; 和 2006 年 12 月 22 日提交的美国临时申请 No. 60/871, 743。

[0225] 以下 DNA 序列根据布达佩斯条约的条款保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection(ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA), 如下所述:

[0226]	材料	保藏号	保藏日
[0227]	$\alpha 5/\beta 1$ 7H5. 4. 2. 8	PTA-7421	2006 年 3 月 7 日
[0228]	$\alpha 5/\beta 1$ 7H12. 5. 1. 4	PTA-7420	2006 年 3 月 7 日

[0229] 本文保藏是依据国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约(Budapest Treaty)及其(布达佩斯条约)实施细则的规定进行的。这保证了自保藏之日起保存保藏的存活培养物 30 年。保藏物可根据布达佩斯条约的条款通过 ATCC 获得, 并服从 Genentech 公司与 ATCC 之间的协议, 它保证了在有关美国专利授权后或者在任何美国或外国专利申请向公众公开后, 以两者中居先者为准, 公众可永久且不受限制的获得保藏培养物的后代, 而且保证了依据 35 U. S. C. 122 及依照它的管理章程(包括 37 C. F. R. 1. 14, 特别要提及 8860G 638) 由美国专利和商标局长批准的个人将有资格获得保藏培养物的后代。

[0230] 本申请的受让人已同意, 若保藏材料的培养物在合适条件下培养时死亡、丢失或遭到破坏, 则他将在接到通知后迅速用同一培养物的另一份材料更换。所保藏材料的可获得性并不解释为对违反任何政府机构依据其专利法所授予的权利实施本发明的许可。

[0231] 除非另有说明, 实施例中提及的商品化试剂依照制造商的说明书使用。下文实施例和整篇说明书中以 ATCC 编号所鉴别的那些细胞的来源是美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, Manassas, VA)。除非另有说明, 本发明使用重组 DNA 技术的标准流程, 诸如上文及以下教科书中所记载的那些: Sambrook et al., 见上文; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y., 1989; Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., N. Y., 1990; Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988; Gait, Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, Oxford, 1984; Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan et al., Current Protocols in Immunology, 1991。

[0232] 贯穿整篇说明书和权利要求书, 词语“包含”或其变化形式, 诸如“包括”或“含有”理解为意味着包括所述整数/成分或整数组/成分组, 但不排除任何其它整数/成分或整数组/成分组。

[0233] 认为前述书面描述足以使本领域技术人员能够实施本发明。提供下述实施例仅出于例示目的, 并非意图以任何方式限制本发明的范围。实际上, 根据上面的描述, 在本文所

显示和描述之外,本发明的多种修饰对于本领域技术人员是显而易见的,而且落在所附权利要求要求的范围内。

[0234] 实施例

[0235] 实施例 1:抗 VEGF 疗法后表达 $\alpha 5 \beta 1$ 的基质细胞的募集

[0236] 将无胸腺小鼠中已用抗 VEGF 抗体 B20-4.1 单一疗法治疗的 HT-29 人结直肠癌异种移植物的切片针对抗 $\alpha 5 \beta 1$ 表达染色。与在本研究中用对照抗体(抗豚草抗体)治疗的对照组相比,B20-4.1 单一疗法产生与很小或无活性对应的中值距终点时间(time to endpoint, TTE)。已对所述肿瘤进行一周两次,持续 58 天的测量。当动物的肿瘤达到终点体积 1000mm^3 时或者在 58 天时,以先到者为准,对它们实施安乐死,并且为每只小鼠计算 TTE。已从百分比肿瘤生长延迟(% TGD) 确定治疗结果,将% TGD 定义为:治疗小鼠的中值 TTE 比对照小鼠的中值 TTE 的百分比增加,使用 Logrank 分析, $0.01 \leq P \leq 0.05$ 视为显著差异, $P < 0.01$ 视为高度显著差异。对照组的中值 TTE 值为 20.6 天。B20-4.1 单一疗法的治疗产生与没有活性对应的 20.1 天中值 TTE。

[0237] 图 1 显示了用抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体染色的肿瘤切片。在抗 VEGF 治疗后观察到增加的基质细胞募集。这些基质细胞对整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 为阳性(亮绿染色)。

[0238] 实施例 2:抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体

[0239] 给小鼠注射纯化的人 $\alpha 5 \beta 1$ (Chemicon CC1027)。将表达抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的浆细胞瘤细胞分离并转化入杂交瘤细胞系。将命名为 7H5.4.2.8 和 7H12.5.1.4 的两个杂交瘤细胞系保藏于 ATCC。见上文。由 7H5.4.2.8 杂交瘤产生的抗体是 mIgG2a κ 抗体(这里也称为“7H5 抗体”)。由 7H12.5.1.4 杂交瘤产生的抗体是 mIgG2b κ 抗体(这里也称为“7H12 抗体”)。

[0240] 实施例 3:HUVEC 直接结合测定法

[0241] 用 PBS 将含有生长中的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的组织培养物清洗两次。用 3-4ml 5mM EDTA/PBS 溶液将细胞从培养瓶脱离。将新鲜的培养基加给细胞并混合。对该混合物中的细胞的等分试样计数。将细胞离心并用清洗缓冲液(50mM Tris,150mM NaCl, pH7.5) 清洗一次。调整细胞浓度,使得可以将细胞以 25ul/孔以 25,000 细胞/孔接种到 96 孔 MSD 高结合平板上,或者 4,000 细胞/孔在 384 孔平板上(分别为 Cat#L11XB-1 或 #L11XB-2, Meso ScaleDiagnostics, LLC)。将细胞在平板上于室温温育 1 小时以允许捕获。为了封闭孔,将 25ul 存储缓冲液(在 TBS(50mM Tris,150mM NaCl)+1mM CaCl_2 /1mM MgCl_2 , pH7.5) 中的 30%胎牛血清(FBS))加入孔并于室温温育 30 分钟至 1 小时。

[0242] 用测定缓冲液(带有 1mM CaCl_2 /1mM MgCl_2 的 TBS, pH7.2+2-4% FBS) 将抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体连续稀释以具有多种抗体浓度。用清洗缓冲液清洗孔两次,然后吸干。将 25ul 抗体稀释液加入孔,然后在冰上温育 1 小时。用 TBS 将孔清洗三次。

[0243] 将 25ul 0.5ug/ml xmuFc-sulfo-tag 溶液加入每个孔并且在冰上温育 45 分钟至 1 小时。xmuFc-sulfo-tag 是山羊抗鼠 IgG(产品目录号 R23-AC-5)。添加 MSD-SA-tag(产品目录号 R32-21-AD-5),并在冰上温育 45 分钟至 1 小时。用 TBS 将孔清洗三次。将 150ul 2X 阅读缓冲液加入每个孔(4X MSD 阅读缓冲液,用 dH_2O 稀释至 2X, cat # R92TD-1(无表面活性剂))。将随后的电化学发光(ECL)信号通过光电二极管来测量并且使用 MSD 阅读仪(默认 6000 方案)量化为相对光单位。图 2 显示了 HUVEC 直接结合测定法的结果。7H5 抗

体的 EC50 为 0.22nM。7H12 抗体的 EC50 为 0.38nM。

[0244] 实施例 4:抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体 FACS 测定法

[0245] 将 7H12 或 7H5 抗体与 RAJI 细胞 (不表达 $\alpha 5 \beta 1$ mRNA 的细胞系) 或 HUVEC 细胞 (表达高水平 $\alpha 5 \beta 1$ mRNA 的细胞系) 在 100 μ l 中温育。使用荧光偶联的第二抗体来检测结合的细胞。图 3 显示了通过 FACS 分析,7H12 和 7H5 结合 HUVEC 细胞而不结合 RAJI 细胞。通过使用兔滑膜细胞 (HIG-82) 或恒河猴 (rhesus monkey) 细胞 (CL-160 猕猴 (macaca mulatta) 成纤维细胞或 CRL-1780 视网膜内皮细胞) 实施相同技术,我们观察到 7H12 和 7H5 结合兔和猴细胞。实施例 5:存在抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体时对纤连蛋白的细胞粘附

[0246] 将纤连蛋白 (Sigma F1141 (牛) 或 Roche 1080938 (人)) 在碳酸钠缓冲液中稀释至 1 μ g/ml。将 100 μ l 纤连蛋白溶液加入 NUNC maxisorp 96 孔平板的每个孔并且让其于 4 $^{\circ}$ C 结合过夜 (NUNC 96 孔平底免疫平板, MaxiSorp N/Ster439454 (VWR 62409-002))。然后将孔用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 清洗并用 1% BSA (Sigma A9418) 封闭至少 30 分钟。然后用 PBS 将该平板清洗三次。将 20,000 个 HUVEC 细胞加入每个孔并且与含有 1.4mM $MgCl_2$ 和 1.4mM $CaCl_2$ 的生长培养基中各种浓度的 7H5 或 7H12 温育。然后将该温育混合物加入纤连蛋白包被的平板。在没有加入抑制性抗体的情况中,将在相同生长培养基中的大约 20,000 个细胞加入每个对照孔。

[0247] 将平板以 140g 旋转 5 分钟以使细胞与底物的接触同步。将细胞在 CO₂ 培养箱中培养各种时间长度 (0 至 120 分钟)。培养时间的长度随各种细胞系而不同。然后用 PBS 将平板清洗三次。将所有液体从孔中去除并且于 -80 $^{\circ}$ C 冷冻。然后于室温解冻平板。将 CyQuant 缓冲液 (Molecular Probes CyQuant C7026) 加到孔中并且将平板于室温温育 10 分钟。测量 OD 读数。图 4 显示了 7H5 抗体的 IC50 为 0.85 μ g/ml (3.44nM), 而 7H12 抗体的 IC50 为 0.7 μ g/ml (4.38nM)。

[0248] 实施例 6:使用 HUVEC 细胞的增殖测定法

[0249] 将 96 孔平板用纤连蛋白 (1 μ g/ml) 包被过夜。然后用 PBS 清洗平板。将 3000-5000 个内皮细胞 (EC) 加入 96 孔板的每个孔并且允许完全附着至孔。将抗 $\alpha 5$ 抗体加入 (包括同种型对照)。为每种条件使用 3 个孔。然后将细胞和抗体温育 1-24 小时。在若干浓度 (例如 0 μ g/ml, 4 μ g/ml, 16 μ g/ml, 60 μ g/ml, 120 μ g/ml) 测试抗整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体。

[0250] 然后将细胞用 BrdU 标记,即通过将它们与 2 μ l BrdU 存储溶液 (在 PBS 中 25mg/ml) 在 1ml 组织培养基 (EGM2+ 来自 Clonetics 的所有补充物 (Cat#CC-4176)) 中温育。此温育后,将细胞用 4% PFA 固定,用 1N HCl 处理 20 分钟,用 PBS 清洗若干次,然后在 10% 山羊血清 (带有 0.2% Triton 的 PBS) 中封闭 1-2 小时。然后将细胞用针对 BrdU 的单克隆抗体 (BD Cat#347580, 在带有 0.2% Triton 和 5% 山羊血清的 PBS 中 1:40 稀释) 染色并于 4 $^{\circ}$ C 温育过夜。次日,将细胞用 PBS 清洗 3 次并在黑暗中于室温与 Alexa-594 偶联的抗家兔 (1:800) 第二抗体温育 4 小时。将孔再次清洗并与 DAPI (在 PBS 中 1:10,000 稀释) 温育 10 分钟。用 PBS 最后一次清洗后,通过在 5X 拍摄 DAPI 染色的照片来对每孔总细胞数计数。使用红色滤光器来为在相同视野中对 BrdU 为阳性的细胞拍照。增殖评估为在该视野中对 BrdU 为阳性的细胞的百分比。然后使用 Excel 来分析结果。图 5a 显示了在 5000 的起始细胞数后于 32 小时的 HUVEC 总细胞计数。图 5b 显示了在抗体浓度为 20 μ g/ml 中于 24 小时的 HUVEC 总细胞计数。

[0251] 实施例 7:迁移测定方案

[0252] 将 HUVEC 在 EGM2+ 来自 Clonetics 的所有补充物 (Cat#CC-4176) 中在 5 μ g/ml 纤连蛋白包被的 24 孔平板上培养,直至细胞汇合。然后通过 2 μ l 吸液器尖头对每个孔中央的细胞划线 (scared) 并且洗去通过划线去除的细胞。将带有对照抗体、7H5 或 7H12 的细胞培养基加入不同孔。在 20 μ g/ml 使用所有测试的抗体。然后使细胞允许生长 1 至 2 天。监测创伤区域。图 6 显示了在 0 小时和 30 小时,在带有 ECM-2 中的 20 μ g/ml 抗 α 5 抗体 (7H5) 的情况下 5 μ g/ml 纤连蛋白上的 HUVEC 迁移照片。图 7 是用 7H5 或 7H12 抗体处理的细胞在 30 小时的 % 迁移的图。

[0253] 实施例 8:HUVEC 激活的胱天蛋白酶 -3 免疫染色凋亡测定法

[0254] 将 96 孔平板用纤连蛋白 (1 μ g/ml) 包被过夜。用 PBS 清洗平板。然后,将 3000-5000 个 HUVEC 细胞铺入 96 孔板的每个孔并且在完全培养基 (带有 EGM-2 SingleQuots (Cambrex CC-4176) 的 EBM-2 培养基 (Cambrex CC-3156)) 中培养过夜。如果将 2H-11 小鼠内皮细胞用于凋亡测定法,那么该培养基是带有 10% FBS 的 50/50 培养基。

[0255] 次日,将一组孔改变为无血清培养基并且温育 4-6 小时以使细胞饥饿并且使它们处于非增殖状态。将其他组细胞保持在完全培养基中并且代表活跃增殖中的细胞。在 4-6 小时后,添加抗体 (包括同种型对照)。一般而言,为每种条件使用 3 个孔。然后将细胞与抗体温育 1-48 小时。通常将抗整联蛋白 α 5 β 1 抗体在下列浓度测试:0 μ g/ml,4 μ g/ml,16 μ g/ml,60 μ g/ml 和 120 μ g/ml。

[0256] 此温育后,将细胞用 4% PFA 固定,在 10% 山羊血清 (带有 0.2% Triton 的 PBS) 中封闭 1-2 小时,然后用特异地识别胱天蛋白酶 3 的活化形式的单克隆抗体 (例如来自 BioVision 的家兔抗活性胱天蛋白酶 3 抗体,在带有 0.2% Triton 和 5% 山羊血清的 PBS 中 1:50 稀释) 染色。将抗胱天蛋白酶 3 抗体和固定的细胞于 4 $^{\circ}$ C 温育过夜。次日,将细胞用 PBS 清洗 3 次并与 Alexa-594 偶联的抗家兔第二抗体 (1:800) 在黑暗中于室温温育 4 小时。将细胞再次清洗并与 DAPI (在 PBS 中 1:10,000 稀释) 温育 10 分钟。用 PBS 最后一次清洗后,通过在 5X 拍摄 DAPI 染色的照片来对每孔总细胞数计数。使用红色滤光器来为在相同视野中对活化的胱天蛋白酶 3 为阳性的细胞拍照。凋亡评价为对活化的胱天蛋白酶 3 为阳性的细胞的百分比。然后使用 Excel 来分析结果。图 8 显示了 7H5 和 7H12 没有活跃的诱导凋亡。

[0257] 实施例 9:HUVEC 胱天蛋白酶 -3/7 活性比色测定法

[0258] 使用 7H5 和 7H12 抗体 (来自 Promega 的 Apo-One 胱天蛋白酶 -3/7 测定法,参见标准 96 孔测定法说明书的技术通报 No. 295) 来进行胱天蛋白酶 3/7 活性测定法。

[0259] 一般而言,用纤连蛋白 (1 μ g/ml) 将 96 孔平板包被过夜。用 PBS 清洗平板。然后将 3000-5000 个 HUVEC 细胞铺入 96 孔板的每个孔并且在完全培养基 (带有 EGM-2 SingleQuots (Cambrex CC-4176) 的 EBM-2 培养基 (CambrexCC-3156)) 中培养过夜。如果将 2H-11 小鼠内皮细胞用于凋亡测定法,那么该培养基是带有 10% FBS 的 50/50 培养基。

[0260] 次日,将一组孔改变为无血清培养基并且温育 4-6 小时以使细胞饥饿并且使它们处于非增殖状态。将其他组细胞保持在完全培养基中并且代表活跃增殖中的细胞。在 4-6 小时后,添加抗体 (包括同种型对照)。一般而言,为每种条件使用 3 个孔。然后将细胞与抗体温育 24-48 小时。通常将抗整联蛋白 α 5 β 1 抗体在下列浓度测试:0 μ g/ml,4 μ g/ml,

16 μ g/ml, 60 μ g/ml 和 120 μ g/ml。

[0261] 此温育后,将 100 μ l Apo-One 胰天蛋白酶 3/7 试剂加入每孔,然后使用平板混合器以 300rpm 温和混合 30 秒。然后将平板于室温温育 1 至 8 小时然后使用读板仪。在 485nm 激发波长和 530nm 发射波长测量每孔的荧光。

[0262] 由胰天蛋白酶 3/7 底物的切割产生的荧光信号 (RLU) 指示凋亡。图 9 显示了 7H5 和 7H12 没有活跃的诱导凋亡。

[0263] 实施例 10 :管形成测定法

[0264] 可以对抗 α 5 β 1 抗体评估它们抑制管形成的能力。下列内容是 Nakatsu et al. (2003) *Microvascular Research* 66(2003)102-112 中描述的基于 HUVEC 萌芽和管形成测定法的管形成测定法的一个实例。

[0265] 一般而言,可以将 HUVEC 细胞与右旋糖酐包被的 Cytodex3 微载体 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 以 400 个 HUVEC 每珠的浓度在 1ml EGF-2 培养基中混合。在 37°C 和 5% CO₂, 持续 4 小时,可以每 20 分钟将带细胞的珠子轻柔地振荡。温育后,可以将带有细胞的珠子转移到 25cm² 组织培养瓶 (BD Biosciences, Bedford, MA) 并且在 37°C 和 5% CO₂, 在 5ml EGM-2 中停留 12-16 小时。次日,可以将带细胞的珠子用 1ml EGM-2 清洗三次并且在 2.5 mg/ml 纤维蛋白原 (Sigma, St. Louis, MO) 中重悬于 200 粒细胞包被的珠子 /ml 的浓度。可以将 500ul 纤维蛋白原 / 珠溶液加入在 24 孔组织培养平板的一个孔中的 0.625 单位凝血酶 (Sigma)。纤维蛋白原 / 珠溶液可以于室温凝结 5 分钟,然后在 37°C 和 5% CO₂ 凝结 20 分钟。可以将 1ml EGM-2 (含有 2% FBS) 加入每个孔并且在 37°C 和 5% CO₂ 与纤维蛋白凝块平衡 30 分钟。将培养基从孔中去除并且用 1ml 新鲜培养基更换。可以将大约 20,000 个皮肤成纤维细胞 (Detroit 551, ATCC, Rockville, MD) 铺在该凝块的上面。可以隔天更换培养基。可以监测珠子测定法 7 天。

[0266] 可以将 HUVEC 包被的珠子在纤维蛋白凝胶中温育 2-3 天,该凝胶上带有或者不带有 500ul 抗 α 5 β 1 抗体 (7H5 和 7H12),然后转移到配备有多维轴 (multidimensional axes) 的 Nikon Eclipse TE300 的载物台,并在 37°C 和 5% CO₂ 维持 72 小时。通过考虑纤维蛋白凝胶体积可以计算出将要使用的最终抗体浓度,即最终抗体浓度 = 总抗体质量 / (培养基体积 + 纤维蛋白凝胶体积)。使用 Metamorph 软件可以每 20 分钟从多个珠子捕获图像。使用珠子的高分辨率图像 (例如带有 4x 物镜的 IX70 Olympus 显微镜) 可以完成体外血管定量。与对照 (未处理的) 相比,可以确定每珠芽数目,其中可以将芽定义为长度等于珠子直径的血管。可以通过随意单位测量芽长度。

[0267] 实施例 11 :异种移植物 / 同种异基因移植物肿瘤模型中的联合研究

[0268] 可以在异种移植物 / 同种异基因移植物肿瘤模型中评估 α 5 β 1 拮抗剂疗法和 VEGF 拮抗剂疗法的同时施用和顺次施用。优选的是,所述模型对 VEGF 拮抗剂疗法很少或没有响应。下列内容是可以使用的模型的实例:(a) 无胸腺裸鼠中的 Fo5 同种异基因移植物 (衍生自 mmtv-Her2 转基因小鼠的乳腺肿瘤) (Finkle, D., et al., (2004) *Clin. Cancer Res.* 10 :2499-2511); (b) 无胸腺裸鼠中的 HT29 异种移植物 (人结直肠系); 和 (c) RIP-TbAg (Tg 模型中的胰腺肿瘤)。典型的是,可以腹膜内、皮下或静脉内施用所述疗法。例如,抗 VEGF 抗体可以每周一次施用 10mg/kg 或者每周两次施用 5mg/kg。基于其亲和力和活性,可以估计将要施用的 α 5 β 1 拮抗剂诸如抗体的量。在一个实验中,可以将 VEGF 拮抗剂

和 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂依照同步进度表施用 5-6 周。或者 / 另外,可以顺次施用 VEGF 拮抗剂和 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂 (例如,抗 VEGF 抗体施用三周,接着抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体定量给药三周)。

[0269] 可以基于肿瘤进展、肿瘤灌注 (tumor perfusion)、肿瘤血管密度、形态学和 / 或存活等来评估治疗功效。可以通过例如肿瘤体积和 / 或肿瘤质量来测量肿瘤进展。可以将 FITC-凝集素灌注以及血管标志物染色用于评估伴随肿瘤进展的血管变化。

[0270] 实施例 12 :MDA-MB231 人乳腺肿瘤模型

[0271] 对 HRLN 雌性裸鼠在肋腹皮下注射 5×10^6 个 MDA-MB231 人乳腺癌细胞。(HRLN 是品系名)。允许肿瘤生长,直至它们达到 $80-120 \text{mm}^3$ 的平均大小。然后将携带肿瘤的小鼠分成 4 组,并且当每组的平均肿瘤体积为约 100mm^3 时开始治疗。

[0272] 该研究期间每周对肿瘤体积测量两次。使用标准测径法进行肿瘤体积测量。称为 10E7 的仓鼠抗小鼠整联蛋白 $\alpha 5$ 单抗是在 Genentech 生产的。当肿瘤为 1.5g 或者已过去了 60 天,以先到者为准,则达到该实验的终点。在一些情况中,对响应者跟踪更久。当达到终点时,对动物实施安乐死。

[0273] 处理细节描述如下:

[0274] (1) 对照组 :注射抗豚草对照单抗 ($10 \text{mg}/\text{kg}$, ip (腹膜内, interperitoneally), 一周一次)

[0275] (2) 抗 VEGF 单一药剂组 :注射抗 VEGF 单抗 B20. 4. 1 ($10 \text{mg}/\text{kg}$, ip, 一周一次)

[0276] (3) 联合组 :B20. 4. 1 ($10 \text{mg}/\text{kg}$, ip, 一周一次) + 仓鼠抗小鼠整联蛋白 $\alpha 5$ 单抗 10E7 ($10 \text{mg}/\text{kg}$, ip, 一周两次)

[0277] (4) 抗整联蛋白 $\alpha 5$ 单一药剂组 :注射仓鼠抗小鼠整联蛋白 $\alpha 5$ 单抗 10E7 ($10 \text{mg}/\text{kg}$, ip, 一周两次)

[0278] 对照组数据:

[0279]

研究天数	1	4	9	13	16	20	23	27
动物ID	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)
1	63	75	196	405	550	486	600	1080
2	63	75	126	196	320	320	446	527
3	75	126	288	666	666	936	1080	2048
4	75	126	196	320	320	446	527	936
5	75	126	288	446	486	787	908	1764
6	88	144	221	288	288	405	550	550
7	88	144	320	550	726	1008	1352	2025
8	88	144	144	446	600	1268	1268	1913
9	108	144	245	486	650	700	908	1437
10	144	162	320	527	527	847	1352	2138
平均值	86.5	126.6	234.4	432.8	513.2	720.2	898.9	1441.6
SEM	7.7	9.3	22	43.5	49.7	96.6	112.3	198.2
N	10	10	10	10	10	10	10	10

[0280] 抗 VEGF 单一药剂组数据：

[0281]

研究天数	1	4	9	13	16	20	23	27
动物ID	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)
1	63	108	144	320	405	550	256	500
2	63	63	100	162	221	288	288	550
3	75	196	365	405	500	320	500	550
4	75	75	196	256	288	500	550	1099
5	75	126	196	320	500	500	550	787
6	88	144	221	320	352	446	446	600
7	88	196	365	405	405	666	726	864
8	88	196	288	320	352	384	288	365
9	108	172	256	500	405	320	288	320
10	144	245	416	567	750	968	1296	1296
平均	86.5	152	254.6	357.5	417.8	494.1	518.8	693
SEM	7.7	18.7	32.6	36.9	45.8	64.5	99.1	100
N	10	10	10	10	10	10	10	10

[0282] 抗 VEGF 和抗 $\alpha 5 \beta 1$ 数据：

[0283]

研究天数	1	4	9	13	16	20	23	27
动物ID	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)
1	63	63	63	63	63	108	126	108
2	63	108	172	256	288	288	288	288
3	75	126	126	221	245	245	320	320
4	75	75	75	126	196	288	245	446

[0284]

5	75	108	172	405	352	650	650	908
6	88	196	221	320	320	288	196	196
7	88	75	196	256	196	288	288	446
8	88	88	144	320	320	288	320	405
9	108	126	144	196	256	320	320	486
10	144	221	270	446	600	650	600	787
平均	86.5	118.5	158.1	260.8	283.6	341.3	335.3	438.8
SEM	7.7	16.5	19.9	37.3	44	54.7	52.2	78.1
N	10	10	10	10	10	10	10	10

[0285] 抗整联蛋白 $\alpha 5$ 单一药剂组数据：

[0286]

研究天数	1	4	9	13	16	20	23	27
动物ID	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)	TV (mm ³)
1	63	75	196	320	486	787	1008	2025
2	63	108	126	365	365	726	1008	1352
3	75	75	144	288	288	550	600	1008
4	75	108	144	320	320	847	1152	1960
5	75	108	172	365	365	550	486	1152
6	88	196	352	650	787	908	1352	1666
7	88	100	162	245	352	486	1764	于12/08/06 TP, 肿瘤超过1500mm ³
8	88	126	162	320	446	486	650	650
9	108	288	446	600	1008	1352	936	3179
10	144	162	245	384	352	486	486	288
平均	86.5	134.6	214.8	385.6	476.7	717.7	944.2	1475.6
SEM	7.7	20.7	33.1	42	74.2	86.7	129.7	286.4
N	10	10	10	10	10	10	10	9

[0287] 此初步数据显示了抗 $\alpha 5$ + 抗 VEGF 联合活性的早期迹象。

[0288] 在该研究的终点后，计算了每组的平均肿瘤体积（图 11A）。还绘制了 Kaplan-Meier 曲线图以显示该研究中的剩余动物百分比，作为时间的函数（图 11B）。数据显示，抗整联蛋白 $\alpha 5\beta 1$ 抗体增强了抗 VEGF 在乳腺癌模型中的功效。

[0289] 实施例 13 :家兔耳伤口愈合模型中的 7H12 和贝伐单抗

[0290] 将新西兰白兔称重并用异氟烷 (isofluorane) 麻醉。在每只家兔中,自内表面并沿着两耳廓边缘修剪毛。将任何剩余的毛用脱毛洗液从手术部位去除。将手术部位用聚维酮碘 (betadine scrub) 清洁,接着酒精冲洗。使用无菌技术,将圆形 8mm 打孔活检装置用于在每个耳朵中产生一个到耳软骨深度的伤口。用骨膜起子和精细的剪刀去除在下面的软骨膜。将 **Opsite®** 弹性绷带放置于每个伤口上,并允许该家兔自麻醉恢复。

[0291] 每天去除 **Opsite®** 敷料,检查伤口,表面应用处理,并且应用新鲜的敷料。在第 0 (手术后立即地)、7、10、14 和 18 天,通过测量伤口直径来计算伤口缺口。

[0292] 处理组是:

[0293] 每个伤口 30ul 中的 100ug 贝伐单抗 (抗 VEGF 抗体),每天一次 (n = 4)

[0294] 每个伤口 30ul 中的 100ug 7H12 (抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体),每天一次 (n = 4)

[0295] 每个伤口 15ul 中的 100ug 贝伐单抗 +15ul 中的 100ug 7H2,每天一次 (n = 4)

[0296] 每个伤口 30ul 中的 100ug 曲妥单抗 (抗 HER2 抗体),每天一次 (n = 3)

[0297] 数据显示了抗 VEGF 和抗 $\alpha 5 \beta 1$ 联合疗法在这种血管发生模型中较之单独的单一药剂具有惊人的效果 (图 10)。

[0298] 实施例 14 :结肠癌中的抗 $\alpha 5 \beta 1$ + 抗 VEGF 联合疗法

[0299] 对 HRLN 雌性 nu/nu 小鼠在肋腹皮下注射 1mm^3 HT29 肿瘤碎片 (结肠肿瘤)。允许肿瘤生长,直至它们达到 $80\text{--}120\text{mm}^3$ 的平均大小,之后用疗法治疗。然后将携带肿瘤的小鼠分成 4 组:

[0300]

组	小鼠 数目	治疗方案1				治疗方案2			
		药剂	mg/kg	路径	日程表	药剂	mg/kg	路径	日程表
1	10	对照	10	IP	qwk x 7	PBS	-	IP	biwk x 7
2	10	B20-4.1	10	IP	qwk x 结束	PBS	-	IP	2x/wk至结束
3	10	B20-4.1	10	IP	qwk x 结束	10E7	10	IP	2x/wk至结束
4	10	PBS	-	IP	-	10E7	10	IP	2x/wk至结束

[0301] 在该研究的终点后,计算了每组的平均肿瘤体积 (图 12A)。还绘制了 Kaplan-Meier 曲线图以显示该研究中的剩余动物百分比,作为时间的函数 (图 12B)。数据显示,抗整合蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体增强了抗 VEGF 在结肠癌模型中的功效。

[0302] 实施例 15 :结肠癌中的抗 $\alpha 5 \beta 1$ + 化疗

[0303] 对 HRLN 雌性 nu/nu 小鼠在肋腹皮下注射 5×10^6 个 HCT116 肿瘤细胞 (结肠肿瘤细胞)。允许肿瘤生长,直至它们达到 $80\text{--}120\text{mm}^3$ 的平均大小,之后用疗法治疗。然后将携带肿瘤的小鼠分成 4 组:

[0304]

组	小鼠 数目	治疗方案1				治疗方案2			
		药剂	mg/kg	路径	日程表	药剂	mg/kg	路径	日程表
1	10	PBS	-	IP	biwk x 7	-	-	IP	-
2	10	10E7	10	IP	biwk x 7	-	-	IP	-
3	10	PBS	-	IP	biwk x 7	伊立替康	100	IP	qwk x 3
4	10	10E7	10	IP	biwk x 7	伊立替康	100	IP	qwk x 3

[0305] 使用标准测径法一周两次进行肿瘤体积测量。称为 10E7 的仓鼠抗小鼠整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 单抗是在 Genentech 产生的。对体重在 2 天里测量 5 次,然后每周两次 (biwk) 直至该研究结束。实验的终点是 1.5g 的肿瘤体积或者 60 天,以先到者为准。对一些响应者跟踪更久。当达到终点时,对动物实施安乐死。定量给药体积是 10mL/kg (0.200ml/20g 小鼠),根据体重调整该体积。在施用 10E7 后 30 分钟施用伊立替康 (irinotecan)。对于显示完全消退 (CR) 的动物,将肿瘤植入部位的组织于终点收集并且保存在福尔马林中,接着 70% EtOH,用于随后的研究。将待冷冻的所有样品放置在冷冻模子中,将其在箔中包裹并且在液氮上速冻。

[0306] 在该研究的终点后,计算了每组的平均肿瘤体积 (图 13A)。还绘制了 Kaplan-Meier 曲线图以显示该研究中的剩余动物百分比,作为时间的函数 (图 13B)。数据显示,抗整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体没有增强化疗剂 (伊立替康) 在结肠癌模型中的活性,但是它也不阻碍化疗剂 (伊立替康) 的活性。此观察结果与我们关于在抗 $\alpha 5 \beta 1$ 疗法在抗血管发生中 (一般而言,特别是在肿瘤学背景中的抗血管发生中) 显著有用之前应当发生血管损伤的信念是一致的。通过 VEGF 拮抗剂诸如 **AVASTIN®** 抗体可以引起这种血管损伤。单独地,化疗剂在这种模型中没有引起显著的血管损伤。可以设想所有这些药剂 (VEGF 拮抗剂 / $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂 / 化疗剂) 的同时或顺次使用,使得存在 VEGF 拮抗剂以引起血管损伤。

[0307] 实施例 16 : $\alpha 5 \beta 1$ Scatchard 曲线图

[0308] 使用 Iodogen 方法来将抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体碘化,并且使用 PD-10 柱通过凝胶过滤将放射性标记的抗体自游离 $^{125}\text{I}-\text{Na}$ 纯化。将 R9ab 细胞,即家兔成纤维细胞系 (购自 ATCC, No. CCL-193) 在 24 孔平板中以约 50,000 每孔接种,并且于 37°C 在 5% CO_2 中培养 48 小时。用结合缓冲液 (含有 2% FBS 和 50mM HEPES 的 50:50 DMEM/F12 培养基, pH7.2) 将细胞清洗三次,然后在冰上温育 15 分钟。将清洗后的细胞在冰上与大约 50pM $^{125}\text{I}-$ 抗 $\alpha 5 \beta 1$ 单克隆抗体温育 4 小时,该 $^{125}\text{I}-$ 抗 $\alpha 5 \beta 1$ 单克隆抗体含有递减浓度的未标记抗 $\alpha 5 \beta 1$ 单克隆抗体,该未标记抗 $\alpha 5 \beta 1$ 单克隆抗体在结合缓冲液中连续地从 0.5uM 稀释成 13 个三次重复测试的浓度。用结合缓冲液将细胞清洗三次,然后用 200ul SDS 裂解缓冲液 (1% SDS, 8M 尿素, 100mM 甘氨酸, pH 3.0) 溶解。将细胞溶胞物在 Wallac Wizard1470 γ 计数器上计数。使用 Genentech 的程序 NewLigand 评估结合数据, NewLigand 使用 Munson 和 Robard (Munson, P. and Robard, D. (1980) Anal. Biochem. 107 :220-239) 的曲线拟合算法以确定抗体的结合亲和力和结合位点的浓度。图 14 和 15 显示了在这些结合测定法中, 7H5 抗体具有 0.10nM 的 Kd, 而 7H12 抗体具有 0.30nM 的 Kd。

[0309] 实施例 17 : 抗整联蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ IgG 表位作图 / 竞争性结合测定法

[0310] 首先将抗整合蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ IgG 的三倍连续稀释物在 PBST 缓冲液 (PBS 和 0.5% (w/v) BSA 和 0.05% (v/v) Tween20) 中与人整合蛋白 $\alpha 5 \beta 1$ 抗原 (1 μ g/ml ;R&D) 包被的 96 孔 Nunc Maxisorp 平板于室温温育 1-2 小时,接着加入 0.3nM 生物素化的 h7H5. v1 hIgG1 (由 Genentech, Inc. 产生的 7H5 抗体变体) 温育 15 分钟,0.3nM 生物素化 h7H5. v1 hIgG1 是通过亚最大结合信号 (50-70%) 确定的。然后用 PBT 缓冲液 (PBS 和 0.05% (v/v) Tween20) 清洗该平板 5 次。将结合的生物素化 h7H5. v1 hIgG1 用在 PBST 缓冲液中 1:2500 稀释的链霉亲和素辣根过氧化物酶偶联物 (Pierce) 检测,用 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB, Kirkegaard & Perry Labs, Gaithersburg, MD) 底物显色大约 5 分钟,用 1.0M H_3PO_4 淬灭,并用分光光度法在 450nm 读数。用四参数非线性回归曲线拟合程序 (Kaleidagraph, Synergy Software) 拟合曲线。

[0311] 图 16 显示了结合的 h7H5. v1 受到递增量的冷 m7H5 的竞争。事实上, m7H5 竞争曲线几乎等同于 h7H5. v1 竞争曲线 (数据未显示)。冷 m7H12 也与生物素-h7H5. v1 竞争 $\alpha 5 \beta 1$ 结合,表明 h7H5. v1 和 m7H12 在 $\alpha 5 \beta 1$ 上的结合表位是交叠的。另一方面,对照抗体没有与结合的 h7H5. v1 竞争。

序列表

<110> 健泰科生物技术公司 (Genentech, Inc.)

<120> 牵涉 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂的联合疗法

<130>P2320R1

<150>US 60/784, 704

<151>2006-03-21

<150>US 60/785, 330

<151>2006-03-22

<150>US 60/871, 743

<151>2006-12-22

<160>5

<210>1

<211>124

<212>PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400>1

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

Thr Thr Gly Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
 110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210>2

<211>108

<212>PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400>2

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

Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30

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

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

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr
 65 70 75

Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His
 80 85 90

Gln Tyr Leu Arg Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 95 100 105

Glu Ile Lys

<210>3

<211>451

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的多肽

<400>3

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

Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu Thr
 20 25 30

Asp Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu	35	40	45
Glu Trp Leu Val Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Asn	50	55	60
Ser Ala Leu Lys Ser Arg Met Thr Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys	65	70	75
Ser Gln Val Phe Leu Ile Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Ser	80	85	90
Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Thr Tyr Tyr Gly Met Thr	95	100	105
Thr Thr Gly Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val	110	115	120
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu	125	130	135
Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly	140	145	150
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp	155	160	165
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val	170	175	180
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val	185	190	195
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp	200	205	210
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys	215	220	225
Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly	230	235	240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu	245	250	255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	260	265	270
Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly	275	280	285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe	290	295	300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	305	310	315
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			

	320	325	330
Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
	335	340	345
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu			
	350	355	360
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly			
	365	370	375
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln			
	380	385	390
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp			
	395	400	405
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg			
	410	415	420
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
	425	430	435
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly			
	440	445	450

Lys

<210>4

<211>215

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的多肽

<400>4

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

	80	85	90
Gln Tyr Leu Arg Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu			
	95	100	105
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro			
	110	115	120
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys			
	125	130	135
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys			
	140	145	150
Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr			
	155	160	165
Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu			
	170	175	180
Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys			
	185	190	195
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe			
	200	205	210
Asn Arg Gly Glu Cys			
	215		

<210>5

<211>232

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的多肽

<400>5

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

Ser Gln Val Phe Leu Ile Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Ser		
	80	85 90
Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Thr Tyr Tyr Gly Met Thr		
	95	100 105
Thr Thr Gly Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val		
	110	115 120
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu		
	125	130 135
Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly		
	140	145 150
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
	155	160 165
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
	170	175 180
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
	185	190 195
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp		
	200	205 210
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys		
	215	220 225
Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser		
	230	

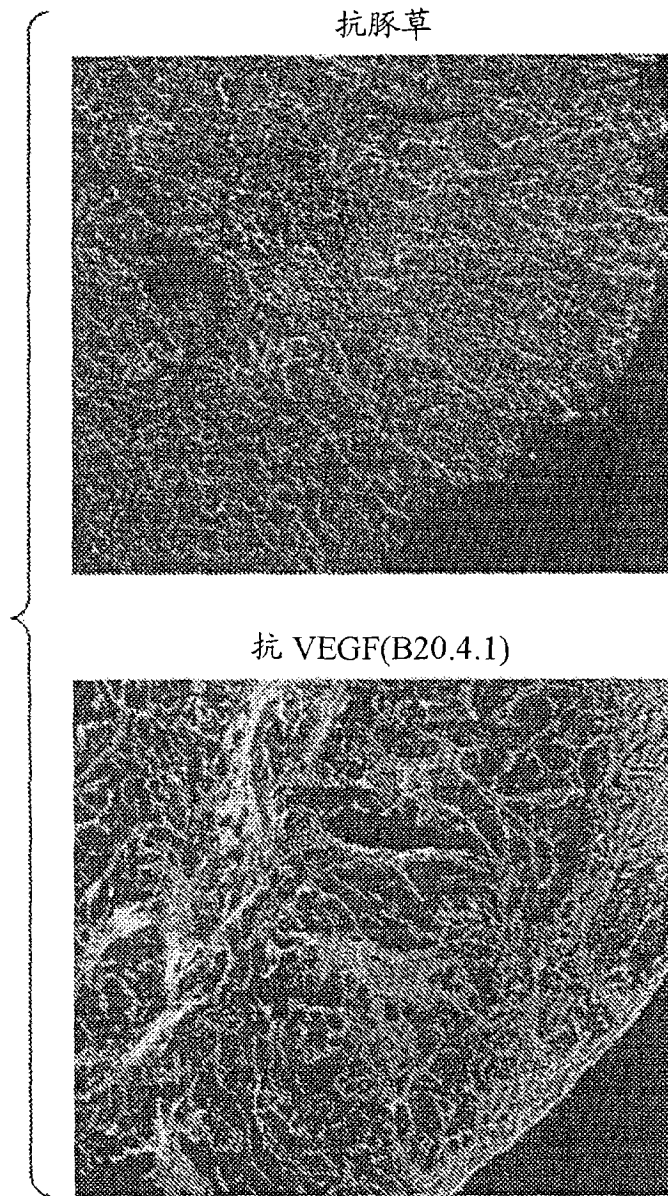


图 1

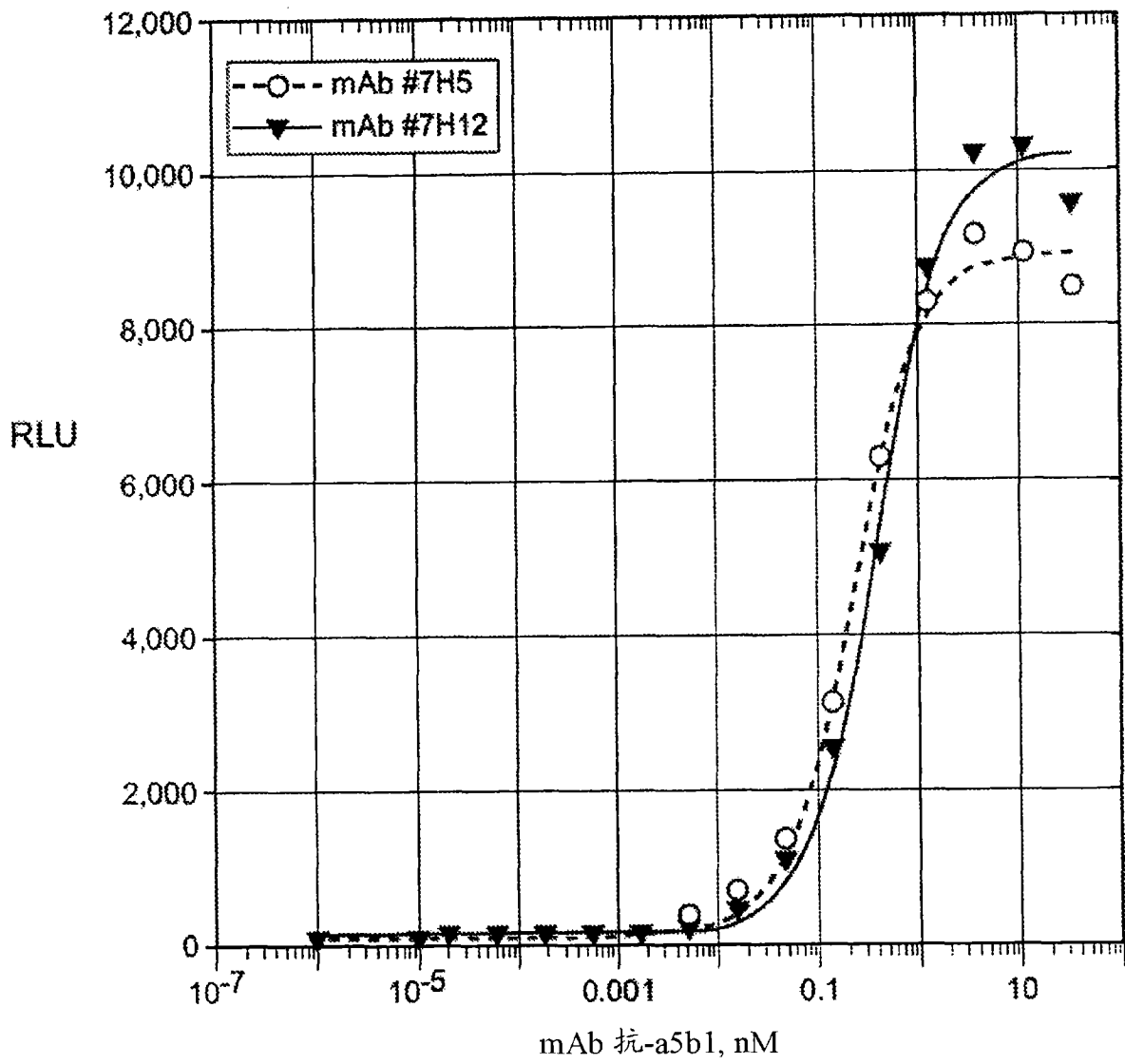


图 2

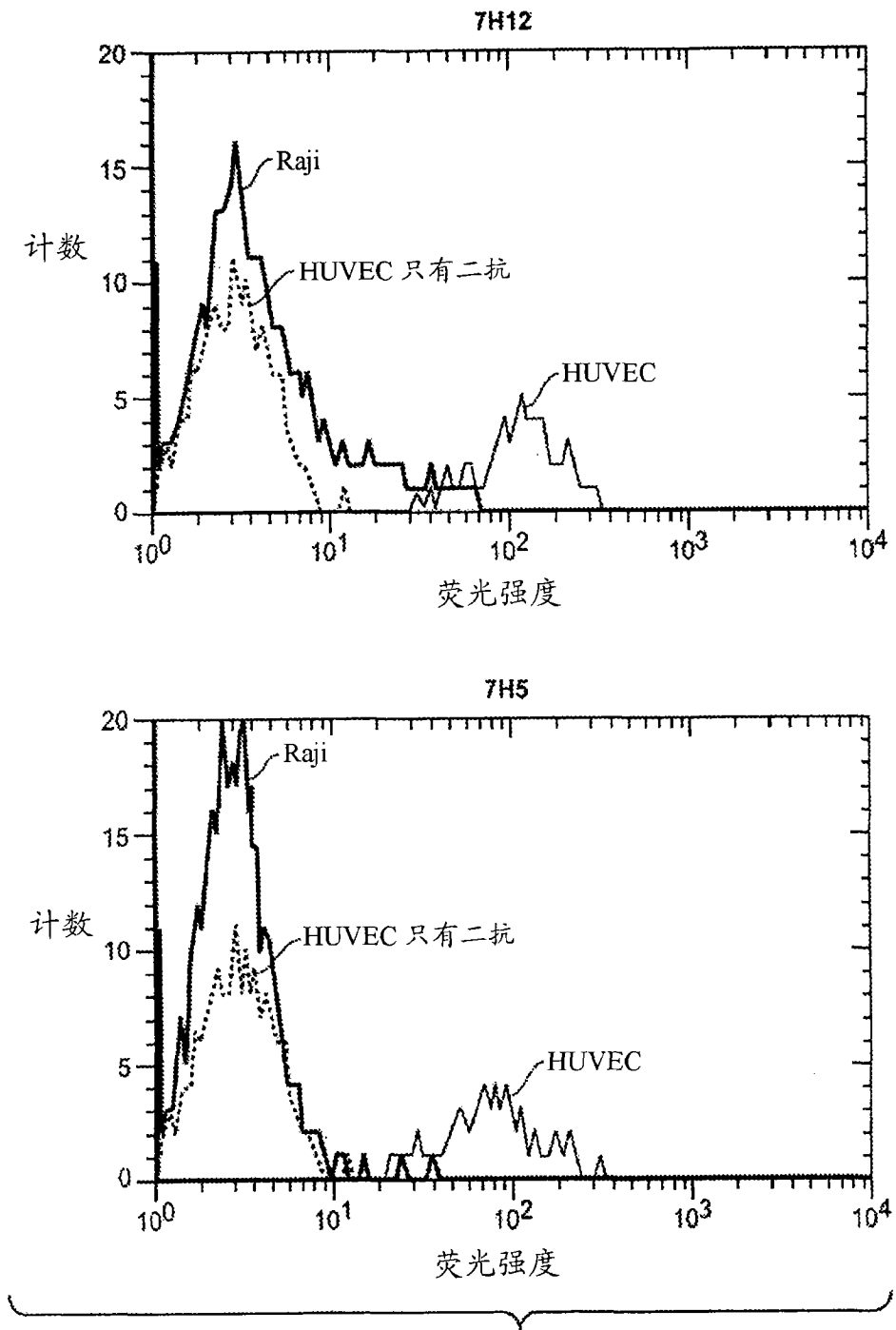


图 3

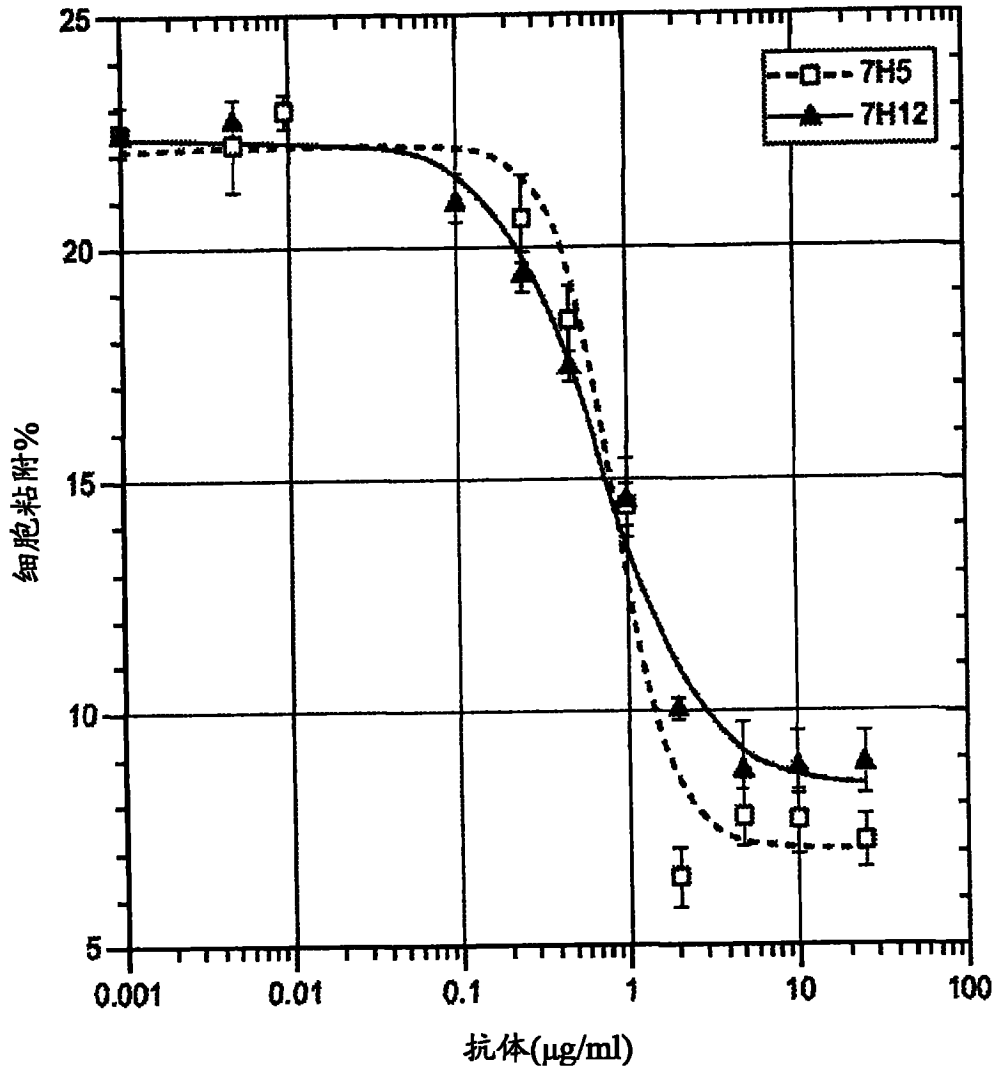


图 4

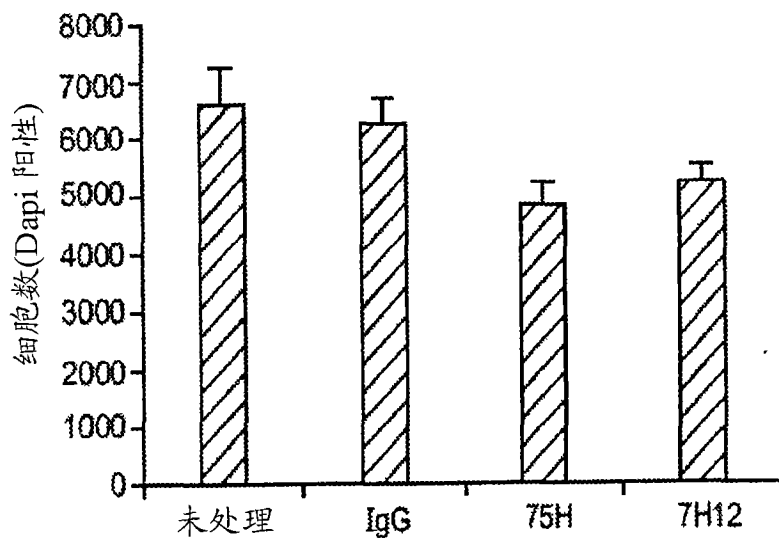


图 5A

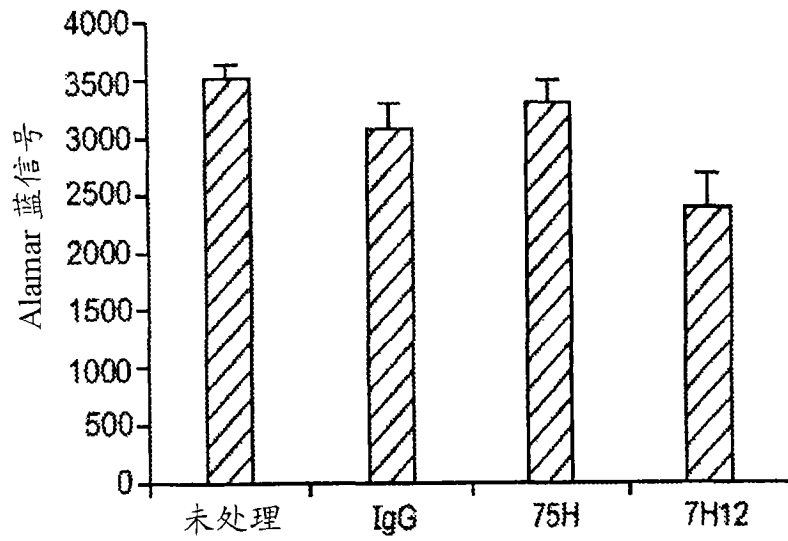


图 5B

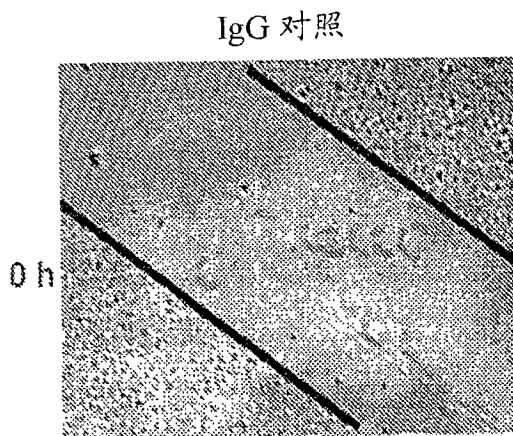


图 6A

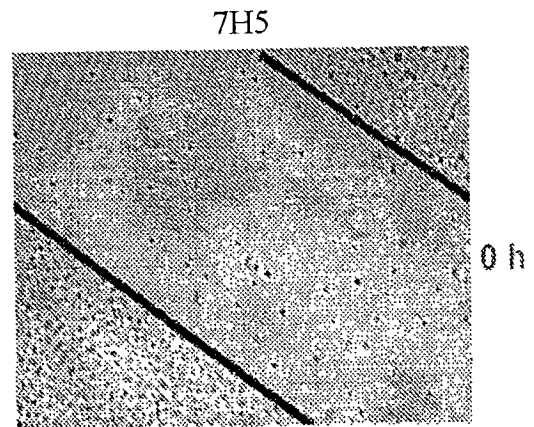


图 6C

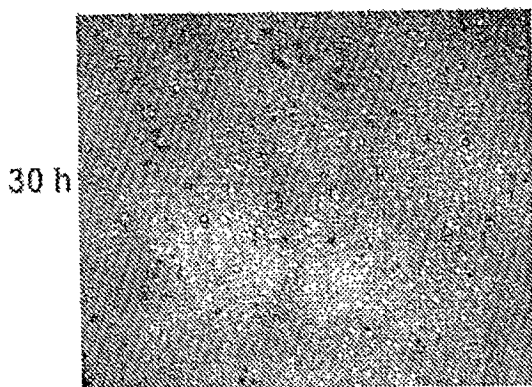


图 6B

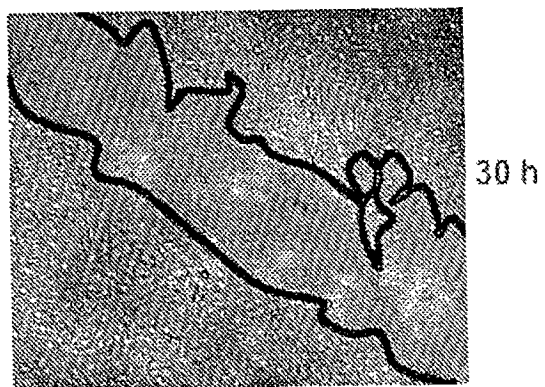


图 6D

HUVEC 迁移-伤口愈合测定法

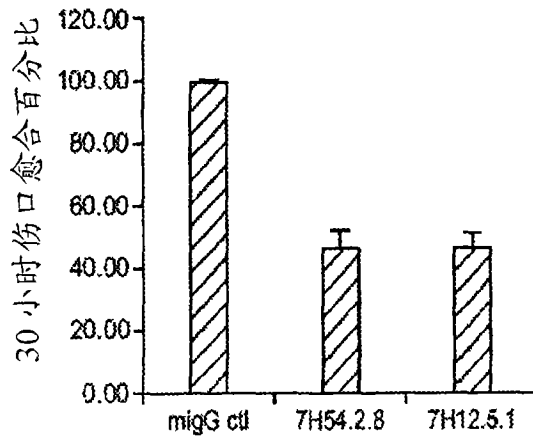


图 7

HUVEC 活化的胱天蛋白酶-3 免疫染色测定法

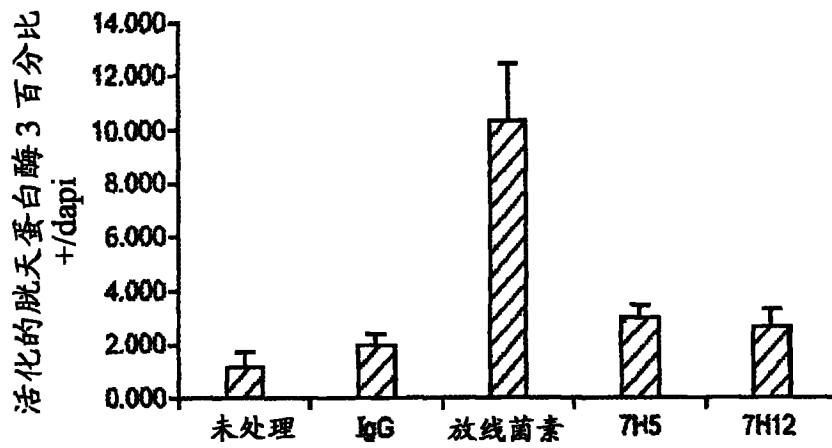


图 8

HUVEC 胱天蛋白酶 3/7 活性测定法
在 EGM-2 中 24 小时后, 比色测定法

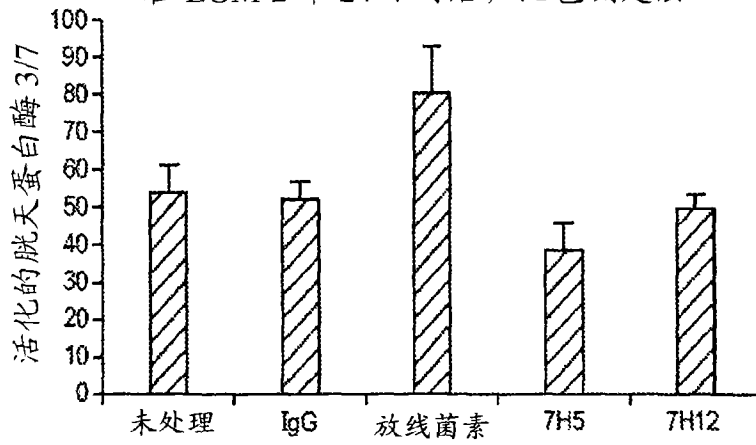


图 9

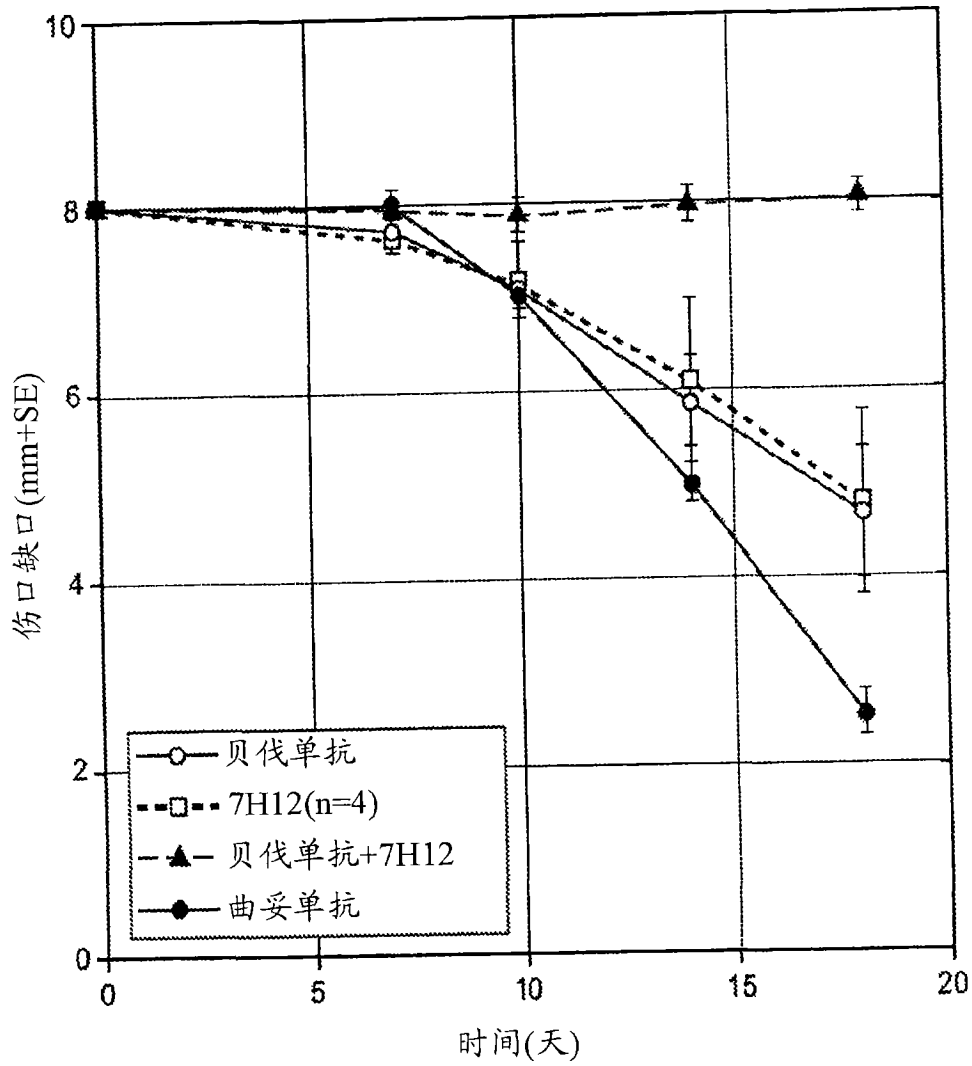


图 10

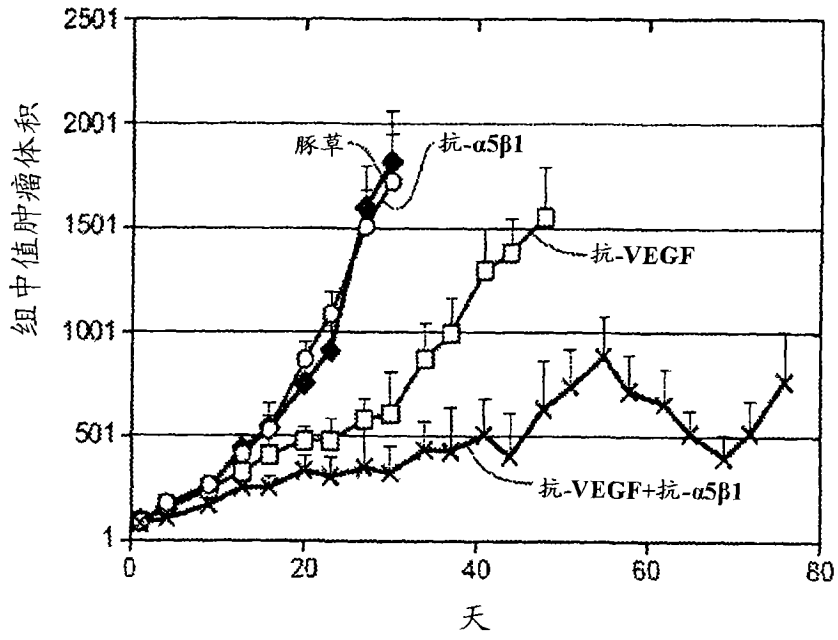


图 11A

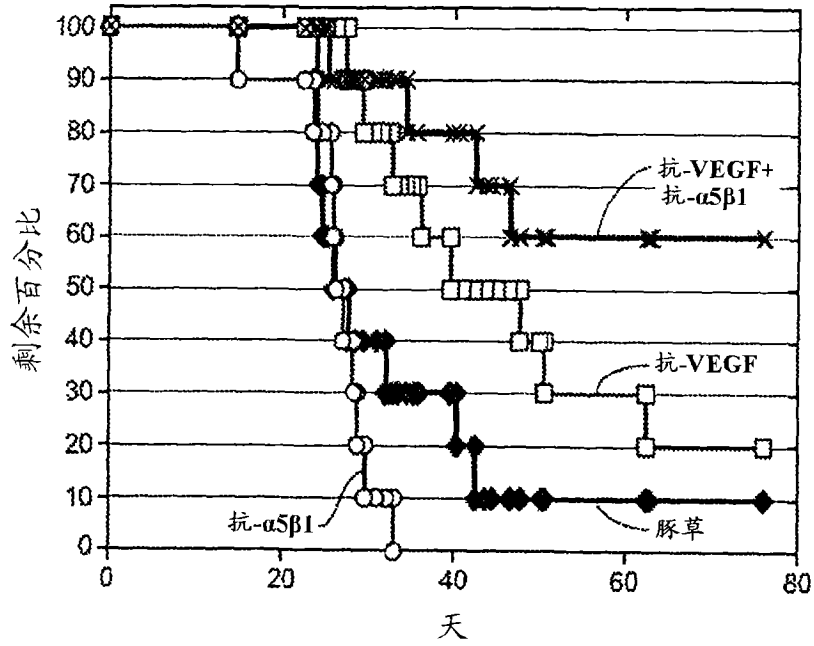


图 11B

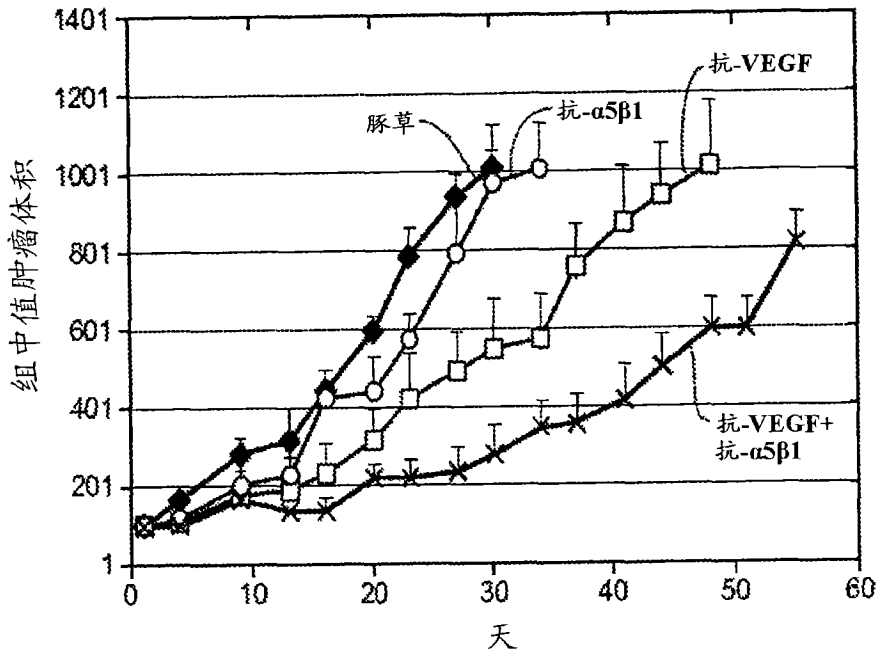


图 12A

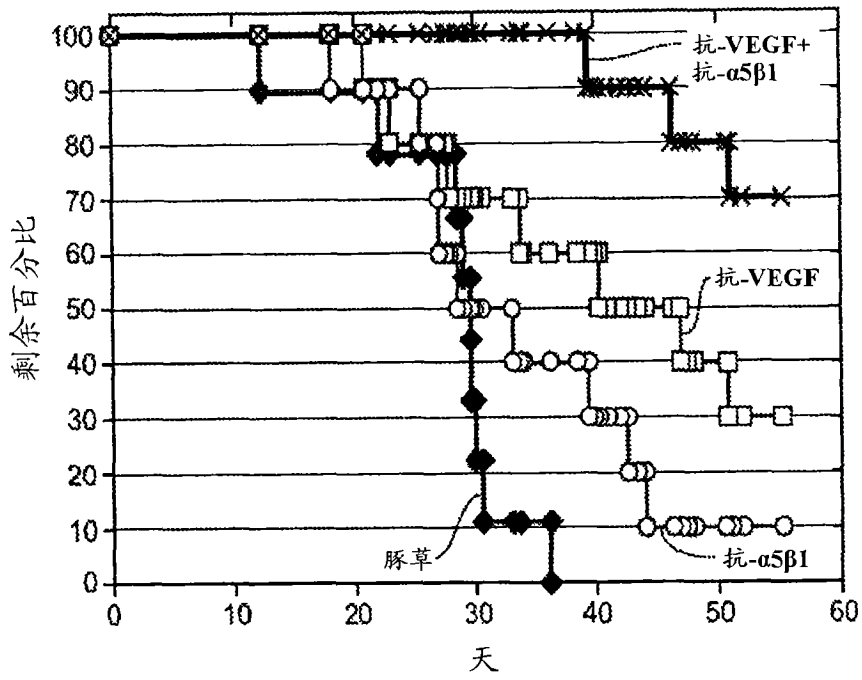


图 12B

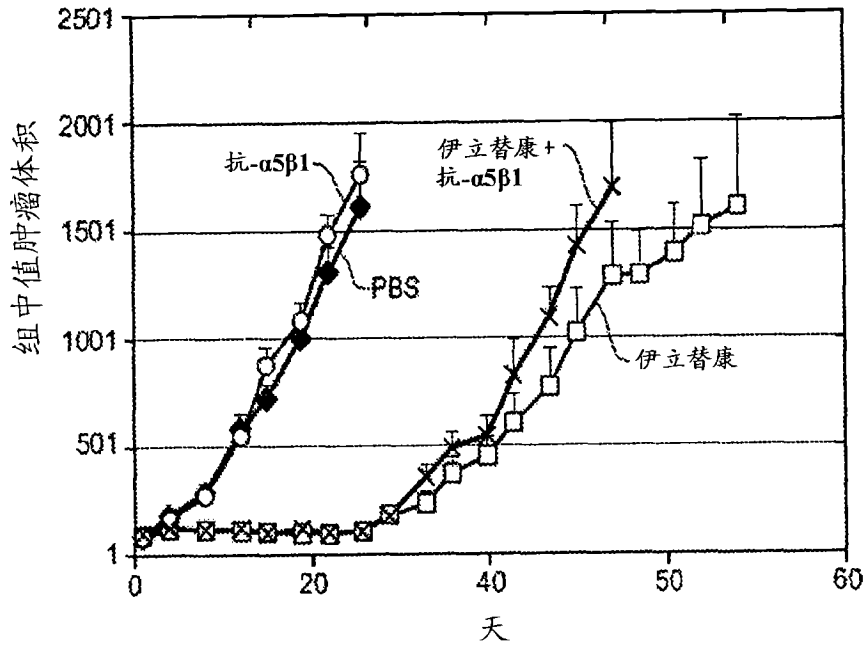


图 13A

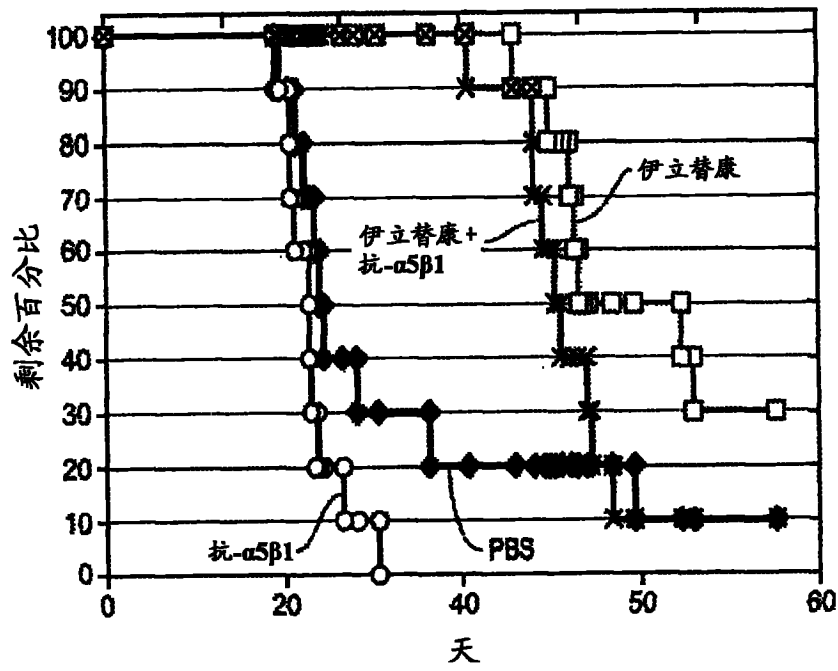


图 13B

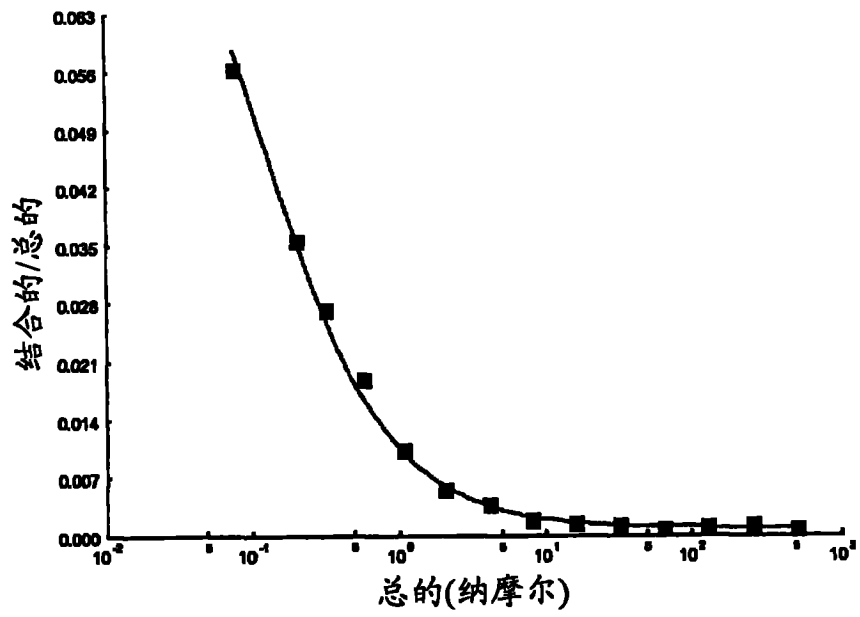
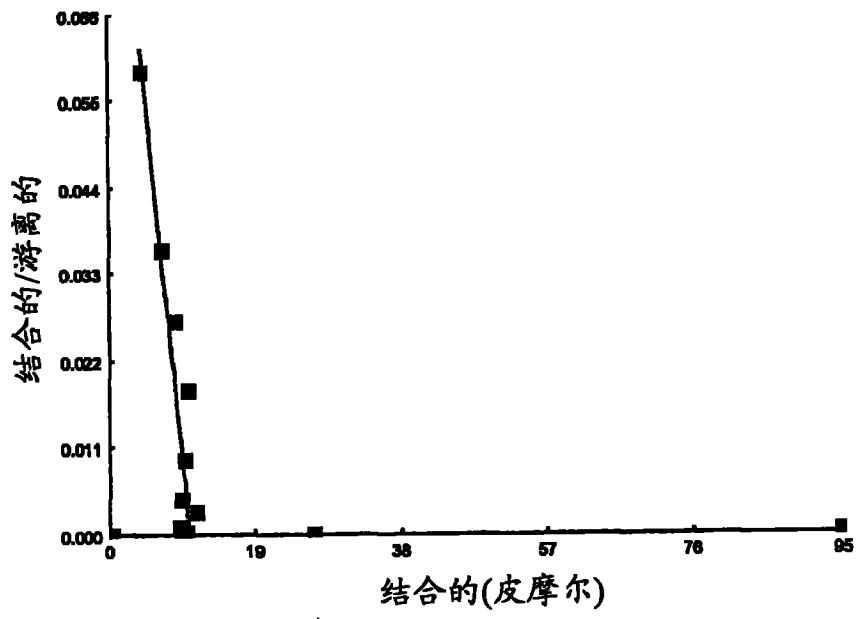


图 14

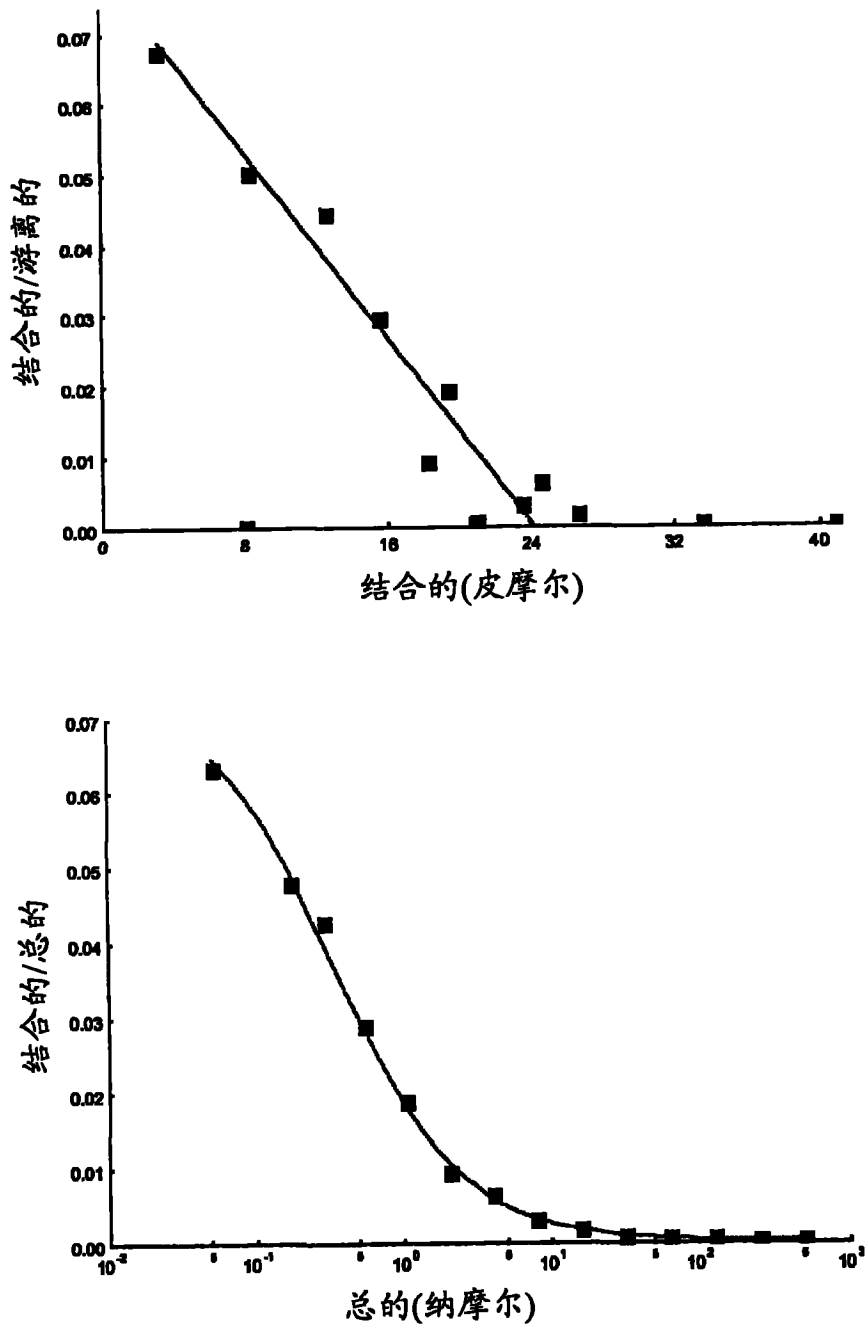


图 15

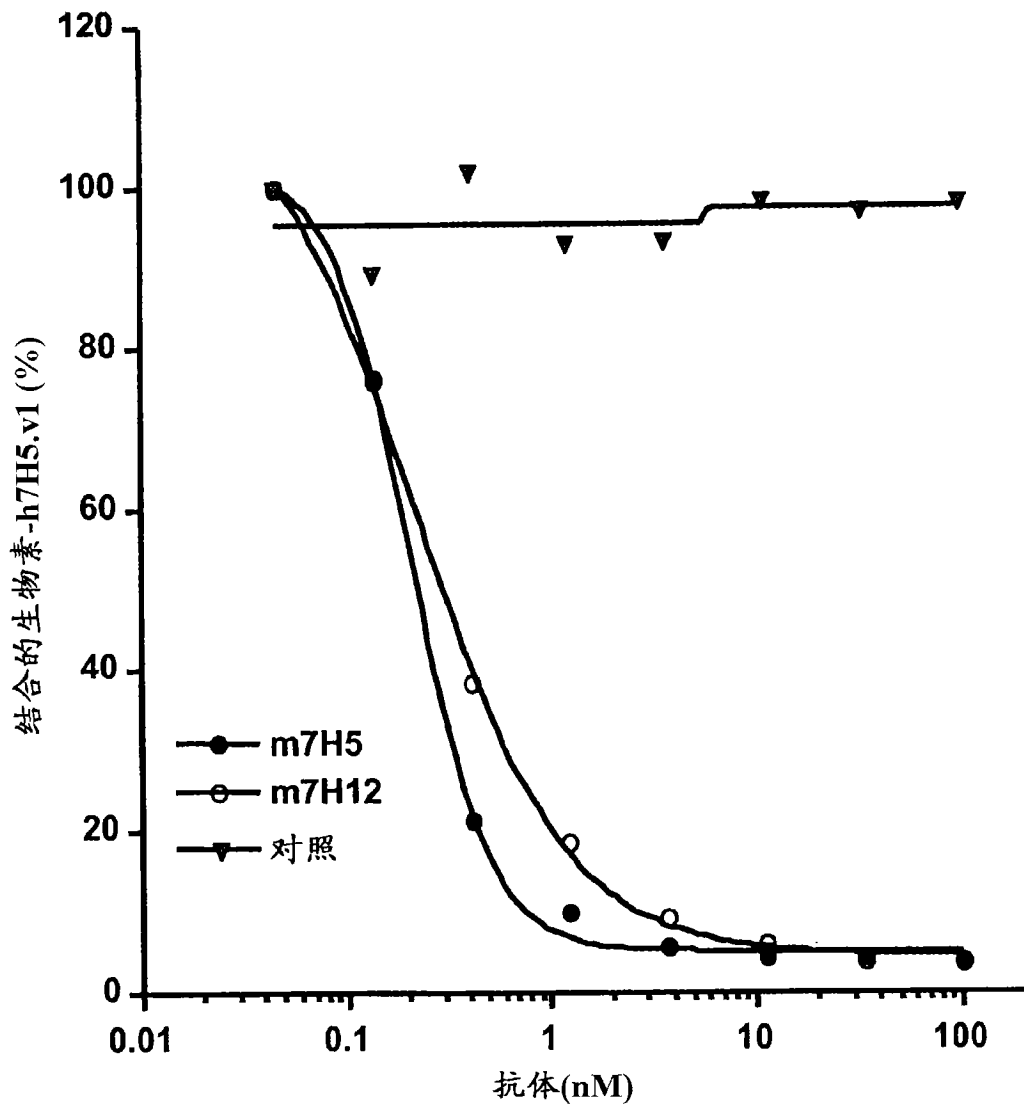


图 16