



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102365297 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 29

(21) 申请号 201080013817. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 03. 23

C07K 16/28(2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 15/13(2006. 01)

61/163, 241 2009. 03. 25 US

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 09. 26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/028291 2010. 03. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02010/111254 EN 2010. 09. 30

(83) 生物保藏信息

ATCC HB 10709 1991. 03. 29

(71) 申请人 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 梁伟庆 格雷戈里·D·普洛曼

吴岩 叶蔚蓝

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 程金山

权利要求书 2 页 说明书 59 页

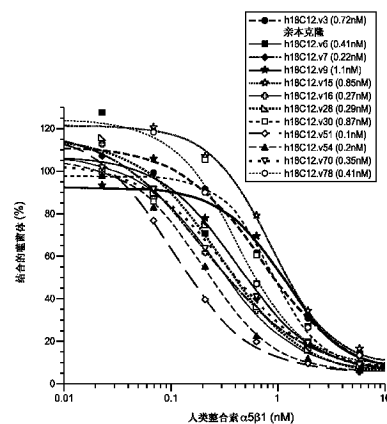
序列表 13 页 附图 12 页

(54) 发明名称

新型抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体及其应用

(57) 摘要

本发明提供新型抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体, 包括所述抗体的组合物和试剂盒, 以及制备和使用所述抗体的方法。



1. 一种抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体,其含有:
包含 CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3 的 VL 结构域,和包含 CDH-H1、CDR-H2、CDR-H1 的 VH 结构域,
所述 CDR-L1 含有 TL-S/T-S/P/T-Q/N-H-F/S-T/I-Y-K/T-I-G/D/S(SEQ ID NO:15);所述 CDR-L2 含有 L/I-N/T-S-D/H/S-G/S-S/L/T-H/Y-N/K/Q/I-K/T-G/A-D/S/V(SEQ ID NO:16);
所述 CDR-L3 含有 G/A-S/A/Y-S/Y-Y-S/A/Y-S/Y/T-GY-V/I(SEQ ID NO:17);和
所述 CDH-H1 含有 GFTFS-N/A-RW-I/V-Y(SEQ ID NO:18);所述 CDR-H2 含有 G IKTKP-N/A/T-I/R-YAT-E/Q-YADS VKG(SEQ ID NO:19);和所述 CDR-H1 含有 L/V-TG-M/K-R/K-YFDY(SEQ ID NO:20)。
2. 权利要求 1 所述的抗体,其中
所述 VL 结构域包含 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3,其各自包含图 3 所示的序列,和
所述 VH 结构域包含 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3,其各自包含图 3 所示的序列。
3. 权利要求 1 所述的抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体,其中
所述 VL 结构域包含 SEQ ID NOS:3-8 中的任一个,和
所述 VH 结构域包含 SEQ ID NOS:11-14 中的任一个。
4. 权利要求 1 所述的抗体,其中
所述 VL 结构域包含 SEQ ID NO:8,和
所述 VH 结构域包含 SEQ ID NO:14。
5. 权利要求 1-4 中任一项所述的抗体,其是人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。
6. 权利要求 1-4 中任一项所述的抗体,其是与 $\alpha 5\beta 1$ 结合的抗体片段。
7. 权利要求 1-4 中任一项所述的抗体,其是全长 IgG1 抗体。
8. 根据权利要求 7 所述的抗体,其中所述抗体含有包含 N297A 置换的 Fc 部分。
9. 一种分离的核酸分子,其编码权利要求 1-8 中任一项所述的抗体。
10. 一种宿主细胞,其包含权利要求 9 所述的核酸。
11. 一种产生抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体的方法,其包括培养权利要求 10 所述的宿主细胞从而产生所述的抗体。
12. 一种免疫缀合物,其包含权利要求 1-4 中任一项所述的抗体和细胞毒性剂。
13. 一种药物组合物,其包含权利要求 1-4 中任一项所述的抗体和药学上可接受的载体。
14. 权利要求 13 所述的药物组合物,其还包含 VEGF 拮抗剂。
15. 权利要求 14 所述的药物组合物,其中所述的 VEGF 拮抗剂是抗-VEGF 抗体。
16. 权利要求 15 所述的药物组合物,其中所述抗-VEGF 抗体为贝伐珠单抗。
17. 权利要求 1-4 中任一项所述的抗体,其还包含可检测标记。
18. 权利要求 17 所述的抗体,其中所述可检测标记是选自由放射性同位素、荧光染料和酶组成的组的成员。
19. 权利要求 1-4 中任一项所述的抗体,其用作药物。
20. 权利要求 1-4 中任一项所述的抗体,其用于治疗涉及异常血管发生和/或血管通透

性或渗漏的疾病或病症。

21. 权利要求 20 所述的抗体,其中所述疾病是选自由癌症、眼病、自身免疫病组成的组的成员。

22. 权利要求 1-4 中任一项所述的抗体,其用于抑制血管发生。

23. 一种检测怀疑含有 $\alpha 5 \beta 1$ 蛋白质的样品中 $\alpha 5 \beta 1$ 蛋白质的方法,所述方法包括:

(a) 使权利要求 17-18 中任一项所述的抗体与所述样品接触;和

(b) 检测抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体与所述 $\alpha 5 \beta 1$ 蛋白质之间的复合体的形成。

24. 权利要求 23 所述的方法,其中所述样品来自诊断患有涉及异常血管发生、异常血管通透性和/或血管渗漏的疾病的患者。

25. 一种治疗患有涉及异常血管发生和/或血管通透性或渗漏的疾病或病症的个体的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的权利要求 1-4 中任一项的抗体。

26. 权利要求 25 所述的方法,其中所述疾病或病症是选自由癌症、眼病和自身免疫病组成的组的成员。

27. 权利要求 26 所述的方法,其中所述癌症选自由结肠直肠癌、肺癌、乳腺癌、肾细胞癌和成胶质细胞瘤组成的组。

28. 权利要求 25 所述的方法,其中所述疾病或病症是选自由视网膜病变、年龄相关的黄斑变性、角膜新血管形成、角膜移植新血管形成、视网膜新血管形成和新血管性青光眼组成的组的成员。

29. 权利要求 25 所述的方法,还包括向所述个体施用有效量的 VEGF 拮抗剂。

30. 权利要求 29 所述的方法,其中所述 VEGF 拮抗剂是抗-VEGF 抗体。

31. 权利要求 30 所述的方法,其中所述抗-VEGF 抗体是贝伐珠单抗。

32. 权利要求 29 所述的方法,其中所述 VEGF 拮抗剂在抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体之前施用。

33. 权利要求 29 所述的方法,其中所述 VEGF 拮抗剂与抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体同时施用。

34. 权利要求 29 所述的方法,其中受试者先用所述 VEGF 拮抗剂治疗直至所述受试者对 VEGF 拮抗剂治疗无反应,然后所述受试者用抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体治疗。

35. 权利要求 29 所述的方法,还包括施用选自由抗肿瘤剂、化疗剂、生长抑制剂和细胞毒性剂组成的组的治疗剂。

36. 一种用于检测已经用 VEGF 拮抗剂治疗的受试者中的 $\alpha 5 \beta 1$ 的试剂盒,所述试剂盒包含:

(a) 权利要求 1-4 中任一项所述的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体;和

(b) 使用说明书。

新型抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体及其应用

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2009 年 3 月 25 日提交的美国临时专利申请号 61/163241 的利益，将其公开内容完全结合在本文作为参考以用于所有目的。

发明领域

[0003] 本发明涉及新型 $\alpha_5\beta_1$ 抗体，包括所述抗体的组合物和试剂盒，以及使用所述抗体的方法。

[0004] 发明背景

[0005] $\alpha_5\beta_1$ 整合素是一种细胞膜糖蛋白，其通过其主要配体纤连蛋白介导细胞-ECM 相互作用。 $\alpha_5\beta_1$ 整合素在细胞迁移、分化和存活中起作用。在肿瘤血管内皮（例如，胃癌、结肠直肠癌、肝细胞癌、子宫宫颈癌、和乳腺癌）和其它血管源性血管中， $\alpha_5\beta_1$ 整合素水平升高。在血管发生过程中， $\alpha_5\beta_1$ 整合素调节周细胞与内皮细胞的缔合以及内皮细胞外基质的装配。因此， $\alpha_5\beta_1$ 整合素是抑制血管发生和使细胞对 VEGF 拮抗剂的作用敏感的有效靶标。

[0006] 因此，在本领域中存在对于靶向 $\alpha_5\beta_1$ 整合素的组合物和方法的需求。本发明满足这一需求和其它的需求。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供来源于单克隆抗体 18C12 的新型抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体，包括所述新型抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体的试剂盒和组合物，以及制备和 / 或使用它们的方法。

[0009] 本发明的一个实施方案提供一种抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体，所述抗体包括：VL 结构域，其包括含有 TL-S/T-S/P/T-Q/N-H-F/S-T/I-Y-K/T-I-G/D/S (SEQ ID NO:15) 的 CDR-L1；含有 L/I-N/T-S-D/H/S-G/S-S/L/T-H/Y-N/K/Q/I-K/F-G/A-D/S/V (SEQ ID NO:16) 的 CDR-L2；含有 G/A-S/A/Y-S/Y-Y-S/A/Y-S/Y/T-GY-V/I (SEQ ID NO:17) 的 CDR-L3；和 VH 结构域，其包括含有 GFTFS-N/A-RW-I/V-Y (SEQ ID NO:18) 的 CDH-H1；含有 GIKTKP-N/A/T-I/R-YAT-E/Q-YADSVKG (SEQ ID NO:19) 的 CDR-H2；和含有 L/V-TG-M/K-R/K-YFDY (SEQ ID NO:20) 的 CDR-H1。在一些实施方案中，所述抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体包括 VL 结构域和 VH 结构域，所述 VL 结构域包括分别含有图 3 列出的序列的 CDR-L1，CDR-L2，和 CDR-L3，所述 VH 结构域包括分别含有图 3 列出的序列的 CDR-H1，CDR-H2，和 CDR-H3，即，这样的 VL 结构域，其包括含有 SEQ ID NO:21, 22, 23, 或 24 列出的序列的 CDR-L1，含有 SEQ ID NO:25, 26, 27, 或 28 列出的序列的 CDR-L2，和含有 SEQ ID NO:29, 30, 31, 或 32 列出的序列的 CDR-L3；和这样的 VH 结构域，其包括含有 SEQ ID NO:34 或 35 列出的序列的 CDR-H1，含有 SEQ ID NO:36 或 37 列出的序列的 CDR-H2，和含有 SEQ ID NO:38, 39, 或 40 列出的序列的 CDR-H3。在一些实施方案中，所述抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体包括含有 SEQ ID NOS:3-8 中任一项的 VL 结构域和含有 SEQ ID NOS:11-14 中任一项的 VH 结构域。在一些实施方案中，所述抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体包括含有 SEQ ID NO:4 的 VL 结构域和含有 SEQ ID NO:11 的 VH 结构域。在一些实施方案中，所述抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体包括含有 SEQ ID NO:5 的 VL 结构域和含有 SEQ ID NO:12 的 VH 结构域。在一些实施方

案中,所述抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体包括含有 SEQ ID NO:6 的 VL 结构域和含有 SEQ ID NO:13 的 VH 结构域。在一些实施方案中,所述抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体包括含有 SEQ ID NO:7 的 VL 结构域和含有 SEQ ID NO:13 的 VH 结构域。在一些实施方案中,所述抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体包括含有 SEQ ID NO:8 的 VL 结构域和含有 SEQ ID NO:14 的 VH 结构域。在一些实施方案中,所述抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体是人的、人源化的或嵌合的抗体。在一个实施方案中,所述抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,所述抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体与 18C12 抗体竞争结合 $\alpha_5\beta_1$ 整合素。在一些实施方案中,所述单克隆抗体是嵌合抗体。在一些实施方案中,所述抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体是结合 $\alpha_5\beta_1$ 的抗体片段。在一些实施方案中,所述抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体选自:Fab, Fab', F(ab)'₂, 单链 Fv(scFv), Fv 片段;双抗体和线性抗体。在一些实施方案中,所述抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体是全长 IgG1 或全长 IgG4。在一些实施方案中,所述抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体是双特异性抗体或多特异性抗体。在一些实施方案中,所述双特异性抗体结合 VEGF 和 $\alpha_5\beta_1$, 并且是 VEGF 拮抗剂。在一些实施方案中,所述抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体具有改变的效应子功能。在一些实施方案中,改变所述抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体以减少或防止抗体依赖性细胞毒性 (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)。在一些实施方案中,抗体的 Fc 部分包括 N297A 置换。在一些实施方案中,所述抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体已被修饰,从而增加或减少其在人中的半衰期(例如,通过改变编码抗体 Fc 部分的核酸序列)。在一些实施方案中,所述 $\alpha_5\beta_1$ 抗体是与另一种实体(例如,治疗剂或可检测的标记)缀合的免疫缀合物的一部分。在一些实施方案中,所述治疗实体是细胞毒性剂(例如,放射性同位素,毒素,生长抑制剂,或化疗剂)。在一些实施方案中,所述可检测的标记是荧光染料、放射性同位素、或酶。

[0010] 本发明的其它实施方案提供编码本文所述的任一种抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体的核酸分子,包括所述核酸的表达载体,和包括所述核酸的宿主细胞。本发明的另一些其它实施方案提供产生本文所述的任一种抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体的方法,所述方法包括培养所述宿主细胞,从而产生所述抗体。在一些实施方案中,所述方法还包括从所述宿主细胞回收所述抗体。

[0011] 本发明的另一些实施方案提供包括本发明的 $\alpha_5\beta_1$ 抗体和药用载体的药物组合物。在一些实施方案中,所述药物组合物还包括至少一种、两种、三种、四种、或多种附加剂,其包括,例如, VEGF 拮抗剂。在一些实施方案中,所述附加剂选自细胞毒性剂、化疗剂、生长抑制剂、或抗血管发生剂。在一些实施方案中,所述 VEGF 拮抗剂是抗-VEGF 抗体。在一些实施方案中,所述抗-VEGF 抗体是贝伐珠单抗 (bevacizumab)。本发明还提供包括检测 $\alpha_5\beta_1$ (例如,在已经用 VEGF 拮抗剂治疗的受试者中) 的使用说明的制品 (articles of manufacture) 和试剂盒。

[0012] 本发明的另一个实施方案提供治疗患有包括异常血管发生、血管通透性或血管渗漏的疾病或病症的受试者的方法。所述方法包括,向受试者施用治疗有效量的本文所述的抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体,由此治疗所述疾病或病症(例如,通过部分或完全抑制异常血管发生、血管通透性或血管渗漏)。在一些实施方案中,还向受试者施用 VEGF 拮抗剂。在一些实施方案中,所述 VEGF 拮抗剂和所述抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体同时给药。在一些实施方案中,所述 VEGF 拮抗剂和所述抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体相继地给药。在一些实施方案中,所述疾病或病症响应 VEGF 拮抗剂治疗。在一些实施方案中,所述疾病或病症选自:癌症,免疫疾病或眼科疾病。根据一个实施方案,所述疾病或病症选自:实体瘤,转移性肿瘤,软组织肿瘤,具有眼睛新血管形成的疾病,具有异常血管发生的炎性病,在移植到受试者后引起的疾病和具有异常的纤维血管组织增

生的疾病。根据另一个实施方案,所述癌症选自:乳腺癌 (breast cancer) (包括转移性乳腺癌),宫颈癌 (cervical cancer),结肠直肠癌 (colorectal cancer) (包括转移性结肠直肠癌),肺癌 (lung cancer) (包括非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer)),非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkins lymphoma) (NHL),慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia),肾细胞癌 (renal cell cancer),前列腺癌 (prostate cancer) (包括激素拮抗性前列腺癌 (hormone refractory prostate cancer)),肝癌 (liver cancer),头和颈癌 (head and neck cancer),黑素瘤 (melanoma),卵巢癌 (ovarian cancer),间皮瘤 (mesothelioma),软组织癌 (soft tissue cancer),胃肠基质瘤 (gastrointestinal stromal tumor),多形性成胶质细胞瘤 (glioblastoma multiforme) 和多发性骨髓瘤 (multiple myeloma)。根据另一个实施方案,所述疾病选自:视网膜病变 (retinopathy),年龄相关的黄斑变性 (age-related macular degeneration) (例如,湿性 AMD (wet AMD)),糖尿病性黄斑水肿 (diabetic macular edema),视网膜静脉闭塞 (retinal vein occlusion) (RVO),和干性 AMD (dry AMD) / 地理性萎缩 (geographic atrophy) (用于预防湿性 AMD 进展) 发红 (rubeosis); 银屑病 (psoriasis), 炎性肾病 (inflammatory renal disease), 溶血性尿毒症综合征 (haemolytic uremic syndrome), 糖尿病肾病 (diabetic nephropathy) (例如,增生性糖尿病肾病 (proliferative diabetic retinopathy)), 关节炎 (arthritis) (例如,银屑病关节炎 (psoriatic arthritis), 骨关节炎 (osteoarthritis), 类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis)), 炎性肠病 (inflammatory bowel disease), 慢性炎症 (chronic inflammation), 慢性视网膜脱离 (chronic retinal detachment), 慢性葡萄膜炎 (chronic uveitis), 慢性玻璃体炎 (chronic vitritis), 角膜移植排斥 (corneal graft rejection), 角膜新血管形成 (corneal neovascularization), 角膜移植新血管形成 (corneal graft neovascularization), 局限性回肠炎 (Crohn' s disease), 近视 (myopia), 眼睛新血管病 (ocular neovascular disease), 佩吉特病 (Pagets disease), 类天疱疮 (pemphigoid), 多动脉炎 (polyarteritis), 激光放射状角膜切开术后 (post-laser radial keratotomy), 视网膜新血管形成 (retinal neovascularization), Sogrens 综合征 (Sogrens syndrome), 溃疡性大肠炎 (ulcerative colitis), 移植排斥 (graft rejection), 肺部炎症 (lung inflammation), 肾病综合征 (nephrotic syndrome), 水肿 (edema), 与恶性病相关的腹水 (ascites associated with malignancies), 中风 (stroke), 血管纤维瘤 (angiofibroma) 和新血管性青光眼 (neovascular glaucoma)。在一个实施方案中,所述方法还包括向受试者施用额外的治疗剂 (例如,抗肿瘤剂、化疗剂、生长抑制剂、或细胞毒性剂)。

[0013] 本发明的另一实施方案提供了治疗受试者中癌症的方法,所述方法包括:向受试者施用治疗有效量的 VEGF 拮抗剂和抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体。在一些实施方案中,VEGF 拮抗剂和抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体同时施用。在一些实施方案中,VEGF 拮抗剂和抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体依次施用。在一些实施方案中,所述癌症响应 VEGF 拮抗剂疗法。

[0014] 本发明的另一实施方案提供了治疗患有 AMD 的受试者中的年龄相关的黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) (包括,例如湿性年龄相关的黄斑变性 (wet age-related macular degeneration)) 的方法,所述方法包括:向受试者提供治疗有效量的 VEGF 拮抗剂和抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体。在一些实施方案中,VEGF 拮抗剂和抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体同时

施用。在一些实施方案中, VEGF 拮抗剂和抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体依次施用。在另一实施方案中, 提供一种治疗受试者的自身免疫病的方法, 包括提供同时或依次施用治疗有效量的 VEGF 拮抗剂和 $\alpha_5\beta_1$ 拮抗剂的步骤。

[0015] 在一些实施方案中, 最初向欲治疗的受试者施用 VEGF 拮抗剂, 随后向该受试者施用抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体。在一些实施方案中, VEGF 拮抗剂和 $\alpha_5\beta_1$ 拮抗剂同时施用给受试者。在一些实施方案中, 抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体 VEGF 拮抗剂最初施用给欲治疗的受试者, 并且 VEGF 拮抗剂随后施用给受试者。在一些实施方案中, 用 VEGF 拮抗剂治疗受试者直至受试者对 VEGF 拮抗剂治疗无反应, 且随后用抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体治疗受试者。在一特定实施方案中, 当癌症为非侵袭性或早期时, 用 VEGF 拮抗剂治疗受试者, 当癌症为侵袭性时, 用抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体治疗受试者。在另一实施方案中, 经抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体治疗的受试者的患病组织中的 $\alpha_5\beta_1$ 水平与来自未患病的受试者的组织相比或非患病组织相比升高。在此情况下, 所述方法可进一步包括检测受试者中 (例如用 VEGF 拮抗剂治疗后的患病组织中) 的 $\alpha_5\beta_1$ 的步骤。根据一个实施方案, 侵袭性癌症为转移癌。根据另一实施方案, 早期癌症为借助辅助疗法 (例如化学疗法或外科手术切除) 治疗的癌症。

[0016] 根据本发明的一个实施方案, 将用抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体治疗的受试者在 VEGF 拮抗剂治疗后经历复发或者已变得难以用 VEGF 拮抗剂治疗痊愈。根据另一个实施方案, 将用抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体及 VEGF 拮抗剂治疗的受试者患转移性癌症或之前已经用辅助疗法治疗。在一个实施方案中, 候选患者对化疗剂如伊立替康 (irinotecan) 具复发性、难治性或抗性。这些疾病的实例包括但不限于, 转移性结肠直肠癌 (metastatic colorectal cancer)、复发性转移性结肠直肠癌 (relapsed metastatic colorectal cancer)、转移性乳腺癌 (metastatic breast cancer)、复发性转移性乳腺癌 (relapsed metastatic breast cancer)、转移性 HER2⁺ 乳腺癌 (metastatic HER2⁺ breast cancer)、辅助疗法治疗的乳腺癌 (adjuvant breast cancer)、辅助疗法治疗的 HER2⁺ 乳腺癌 (adjuvant HER2⁺ breast cancer)、转移性胰腺癌 (metastatic pancreatic cancer)、辅助疗法治疗的结肠癌 (adjuvant colon cancer)、辅助疗法治疗的非小细胞肺癌 (adjuvant non-small cell lung cancer)、辅助疗法治疗的直肠癌 (adjuvant rectal cancer)、辅助疗法治疗的非小细胞肺癌 (adjuvant non small cell lung cancer)、转移性非小细胞肺癌 (metastatic non small cell lung cancer)、转移性卵巢癌 (metastatic ovarian cancer)、转移性肾细胞癌 (metastatic renal cell cancer) 及辅助疗法治疗的肾细胞癌 (adjuvant renal cell cancer)。

[0017] 根据一个实施方案, 在用 VEGF 拮抗剂治疗疾病后向患有本文中所述的疾病的受试者施用维持疗法, 其中所述维持疗法为单独施用 $\alpha_5\beta_1$ 拮抗剂或者依次或同时施用 $\alpha_5\beta_1$ 拮抗剂和 VEGF 拮抗剂。

[0018] 在一些实施方案中, VEGF 拮抗剂选自: 抗体、免疫黏附素、肽体 (peptibody)、小分子以及在严格条件下杂交编码 VEGF 的核酸分子的核酸 (例如核酶、siRNA 及适配体 (apatmer))。在一些实施方案中, VEGF 拮抗剂为抗体 (例如单克隆抗体)。根据一个实施方案, 抗 VEGF 抗体能够被 Avastin® 抗体竞争性抑制与人类 VEGF 的结合。根据另一个实施方案, 抗 VEGF 抗体为人类抗体、人源化抗体或嵌合抗体。根据一个特定实施方案, 抗 VEGF 抗体为 Avastin® 抗体。根据另一个实施方案, 抗 VEGF 抗体选自由 Fab、Fab'、F(ab)'₂、

单链 Fv (scFv)、Fv 片段、双抗体 (diabody) 和线性抗体组成的组。根据另一实施方案, VEGF 拮抗剂为结合 VEGF 和 $\alpha_5\beta_1$ 的双特异性抗体, 并且是 $\alpha_5\beta_1$ 的拮抗剂。

[0019] 本发明的另一实施方案提供检测怀疑含有 $\alpha_5\beta_1$ 蛋白的样品中的 $\alpha_5\beta_1$ 蛋白的方法。所述方法包括: (1) 使本文中所述的抗体与样品接触; 及检测抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体与 $\alpha_5\beta_1$ 蛋白的复合体的形成。在一些实施方案中, 样品来自经诊断患有特征为异常血管发生、异常血管通透性及 / 或血管渗漏疾病的患者。

[0020] 本发明的这些和其他实施方案进一步描述在下文的发明详述中。

[0021] 附图简要说明

[0022] 图 1A 和图 1B 描绘下列轻链可变结构域的序列比对: 人类 λ III, 仓鼠 18C12, 嵌合 18C12. v. 1. 1、h18C12. v3、h18C12. v6、h18C12. v6. 1. Lam3、h18C12. v6. 2Lam3 和 h18C12. v6. 1. 5。

[0023] 图 2A 和图 2B 描绘下列重链可变结构域的序列比对: 仓鼠 18C12、h18C12. v3、h18C12. v6、h18C12. v6. 1. Lam3、h18C12. v6. 2Lam3 和 h18C12. v6. 1. 5。

[0024] 图 3 描绘 h18C12. v3 和 h18C12. v3 的亲和力成熟变体 h18C12. v6、h18C12. v7、h18C12. v9、h18C12. v15、h18C12. v16、h18C12. v28、h18C12. v30、h18C12. v51、h18C12. v54、h18C12. v70 和 h18C12. v78 的 CDR 序列。

[0025] 图 4 描绘展示 h18C12. v3 亲本克隆和 18C12 亲和力成熟变体 h18C12. v6、h18C12. v7、h18C12. v9、h18C12. v15、h18C12. v16、h18C12. v28、h18C12. v30、h18C12. v51、h18C12. v54、h18C12. v70 和 h18C12. v78 与人的 $\alpha_5\beta_1$ 整合素结合的噬菌体竞争 ELISA 的结果。

[0026] 图 5 描绘 h18C12. v3 亲本克隆和 h18C12. v3 亲和力成熟变体 h18C12. v6、h18C12. v15、h18C12. v54 和 h18C12. v70 与人 $\alpha_5\beta_1$ 整合素结合的 BIACORE[®] 分析的结果。

[0027] 图 6 描绘嵌合 18C12 及 h18C12. v6. 1. Lam3 与人 $\alpha_5\beta_1$ 整合素结合的 BIACORE[®] 分析结果。

[0028] 图 7 描绘 h18C12. v6. 1 克隆 h18C12. v6. 1. 1、h18C12. v6. 1. 2、h18C12. v6. 1. 3、h18C12. v6. 1. 4 及 h18C12. v6. 1. 5 结合的 BIACORE[®] 分析的结果, 并且列出各 h18C12. v6. 1 克隆在位置 50a、50b、50c 及 50d 处的 CDR-L2 序列。

[0029] 图 8 描绘比较嵌合 18C12 与 h18C12. v6. 1 在干扰 U937 细胞与纤连蛋白结合方面的能力的纤连蛋白结合分析的结果。

[0030] 图 9 描绘比较仓鼠 18C12 与 h18C12. v6. 1. 5 在干扰 U937 细胞与纤连蛋白结合方面的能力的纤连蛋白结合分析的结果。

[0031] 图 10 描绘比较仓鼠 18C12 与 h18C12. v6. 1. 5 在干扰 $\alpha_5\beta_1$ 与纤连蛋白结合方面的能力的纤连蛋白结合分析的结果。

[0032] 图 11 描绘比较嵌合 18C12 与 h18C12. v6. 1 在干扰 HUVEC 细胞在纤连蛋白上迁移方面的能力的 HUVEC 迁移分析的结果。

[0033] 图 12 描绘测定 h18C12. v6. 1. 5+/- 抗-VEGF 在增强存活方面的能力的肿瘤异种移植研究的结果。

[0034] 图 13 描绘测定 h18C12. v6. 1. 5+/- 抗-VEGF 在降低肿瘤负荷方面的能力的肿瘤异种移植研究的结果。

[0035] 发明详述

[0036] I. 前言

[0037] 本发明基于结合 $\alpha_5\beta_1$ 整合素的新抗体的鉴别。 $\alpha_5\beta_1$ 抗体衍生自单克隆抗体 18C12, 并且可以用于多种治疗和诊断方法中。举例来说, $\alpha_5\beta_1$ 抗体可单独使用或与其他药剂组合使用来治疗异常血管发生、瘤形成、眼疾病及自身免疫病。通过在患者中施用抗 $\alpha_5\beta_1$ 蛋白的抗体, 并检测来自患者的样品 (例如活体内或先体外后体内 (*ex vivo*)) 中的 $\alpha_5\beta_1$ 蛋白结合的抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体, 或者, 通过使抗体与来自患者的样品接触并且定性或定量检测与 $\alpha_5\beta_1$ 蛋白结合的抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗体, 所述抗体也可以用来检测患者或患者样品中的 $\alpha_5\beta_1$ 蛋白。

[0038] II. 定义

[0039] “A1 β ha5beta1”或“ $\alpha_5\beta_1$ ”或“a5b1”或“ $\alpha_5\beta_1$ ”为包含两种不同蛋白质 (即亚基 α_5 和 β_1) 的整合素。已经表明 $\alpha_5\beta_1$ 结合至纤连蛋白、L1-CAM 和纤维蛋白原。 $\alpha_5\beta_1$ 整合素也被称作极迟活化-5 (Very Late Activation-5)、VLA-5、alpha5beta1、CD49e/CD29、纤连蛋白受体、FNR 和 GPIIc-IIa。根据一个实施方案, $\alpha_5\beta_1$ 为人 $\alpha_5\beta_1$ 。

[0040] “ α_5 ”在本文中可与 CD49e、 α_5 、整合素 α_5 亚基、VLA-5 α 亚基、GPIIc-IIa 的 IC 亚基及 FNR α 链互换使用, 指的是 $\alpha_5\beta_1$ 整合素的一个亚基。 α_5 具有四个由可变剪接产生并且其细胞质结构域不同的同工型 (A-D)。人 α_5 的同工型的氨基酸序列可分别以例如 Genbank 登录号 X07979、U33879、U33882 及 U33880 发现。

[0041] β_1 也称作 CD29、 β_1 、血小板 GPIIa、VLA- β 链、 β -1 整合素链、CD29、FNRB、MDF2、VLAB、GPIIA、MSK12 以及 VLA5B。人 β_1 的氨基酸序列可以以例如 Genbank 登录号 X06256 被发现。

[0042] 本文中所用的术语 VEGF 是指 165 氨基酸的人血管内皮细胞生长因子及相关 121-、189- 及 206- 氨基酸的人血管内皮细胞生长因子 (如 Leung 等人, *Science* (科学), 246: 1306 (1989) 和 Houck 等人, *Mol. Endocrin.*, 5: 1806 (1991) 所述), 以及其天然存在的等位基因及其经过加工的形式。术语 VEGF 也指来自诸如小鼠、大鼠或灵长类动物的非人类物种的 VEGF。有时来自特定物种的 VEGF 由诸如以下的术语表示: 人 VEGF 用 hVEGF; 鼠 VEGF 用 mVEGF 等。术语 VEGF 也用作指包含 165- 氨基酸人血管内皮细胞生长因子的氨基酸 8 至 109 或 1 至 109 的多肽的截短形式。在本申请中可以例如以“VEGF (8-109)”、“VEGF (1-109)”或“VEGF₁₆₅”来表明对 VEGF 的任何此等形式的提及。“截短”天然 VEGF 的氨基酸位置如天然 VEGF 序列中所示进行编号。比如, 截短天然 VEGF 中的氨基酸位置 17 (甲硫氨酸) 亦为天然 VEGF 中的位置 17 (甲硫氨酸)。截短天然 VEGF 具有与天然 VEGF 相当的对 KDR 及 Flt-1 受体的结合亲和力。根据一实施方案, VEGF 为人 VEGF。

[0043] “VEGF 拮抗剂”是指能够中和、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 受体或编码其的核酸的结合的分子。VEGF 拮抗剂优选地结合 VEGF 或 VEGF 受体。VEGF 拮抗剂包括抗 VEGF 抗体及其抗原结合片段、结合 VEGF 及 VEGF 受体并且阻断配体-受体相互作用的多肽 (例如免疫黏附素、肽体 (peptibody))、抗 VEGF 受体抗体及 VEGF 受体拮抗剂 (如 VEGFR 酪氨酸激酶的小分子抑制剂)、结合 VEGF 的适合体 (apatmer) 和在严格条件下杂交编码 VEGF 或 VEGF 受体的核酸序列的核酸 (例如 RNAi)。根据一个实施方案, VEGF 拮抗剂结合至 VEGF 并且体外抑制 VEGF 诱发的内皮细胞增生。根据一个实施方案, VEGF 拮抗剂, 以高于对非 VEGF 或非 VEGF 受体的亲和力, 结合至 VEGF 或

VEGF 受体。根据一个实施方案, VEGF 拮抗剂以介于 $1 \mu\text{M}$ 与 1pM 之间的 K_d 结合至 VEGF 或 VEGF 受体。根据另一实施方案, VEGF 拮抗剂以 500nM 至 1pM 与 VEGF 或 VEGF 受体结合。

[0044] 根据一实施方案, VEGF 拮抗剂选自例如抗体、肽体、免疫黏附素、小分子或适合体 (Apatmer) 的多肽组成的组。在一实施方案中, 抗体为抗 VEGF 抗体, 例如 AVASTIN[®] 抗体或抗 VEGF 受体抗体例如抗 VEGFR2 或抗 VEGFR3 抗体。VEGF 拮抗剂的其他实例包括 VEGF-Trap、Mucagen、PTK787、SU11248、AG-013736、Bay439006 (索拉非尼 (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。

[0045] “抗 VEGF 抗体”是以足够的亲和力和特异性结合至 VEGF 的抗体。优选地, 本发明的抗 VEGF 抗体可以用作作用于靶向并且干扰涉及 VEGF 活性的疾病或状况的治疗剂。抗 mVEGF 抗体通常不会结合至例如 VEGF-B 或 VEGF-C 的其他 VEGF 同源物, 也不会结合至诸如 PlGF、PDGF 或 bFGF 的其他生长因子。抗 VEGF 抗体是与杂交瘤 ATCC HB 10709 产生的单克隆抗 VEGF 抗体 A4.6.1 结合至相同抗原表位的单克隆抗体。抗 VEGF 抗体更优选为根据 Presta 等人 (1997) Cancer Res (癌症研究). 57 :4593-4599 产生的重组人源化抗 VEGF 单克隆抗体, 包括但不限于称作贝伐珠单抗 (BV ; Avastin[®]) 的抗体。根据另一实施方案, 可使用的抗 VEGF 抗体包括但不限于 W02005/012359 中所揭示的抗体。根据一实施方案, 抗 VEGF 抗体包含 W02005/012359 的图 24、25、26、27 和 29 中所揭示的任一抗体 (例如 G6、G6-23、G6-31、G6-23.1、G6-23.2、B20、B20-4 和 B20.4.1) 的重链可变区及轻链可变区。在另一实施方案中, 称作兰尼单抗 (ranibizumab) 的抗 VEGF 抗体是施用于眼疾病, 例如糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy) 及湿性 AMD 的 VEGF 拮抗剂。

[0046] 抗 VEGF 抗体“贝伐珠单抗 (Bevacizumab, BV)”, 也称作“rhuMAbVEGF”或“Avastin[®]”是根据 Presta 等人 (1997) Cancer Res (癌症研究). 57 :4593-4599 产生的重组人源化抗 VEGF 单克隆抗体。其包含突变的人类 IgG1 构架区和来自阻断人类 VEGF 与其受体结合的鼠抗 hVEGF 单克隆抗体 A.4.6.1 的抗原结合互补决定区。贝伐珠单抗的氨基酸序列的大约的 93%, 包括大部分构架区, 源自人类 IgG1, 且序列的约 7% 来自鼠抗体 A4.6.1。贝伐珠单抗的分子量为约 149,000 道尔顿 (dalton) 且经糖基化。其他抗 VEGF 抗体包括美国专利第 6,884,879 号和 W02005/044853 中所描述的抗体。

[0047] 抗 VEGF 抗体兰尼单抗 (Ranibizumab) 或 LUCENTIS[®] 抗体或 rhuFabV2 是人源化的亲和力成熟的抗人 VEGF Fab 片段。兰尼单抗通过标准重组技术方法, 在细菌发酵和大肠杆菌 (E. coli) 表达载体中产生。兰尼单抗未经糖基化且分子质量为约 48,000 道尔顿。参见 W098/45331 及 U.S. 2003/0190317。

[0048] 可借助竞争性抑制 / 结合分析来鉴别特征为与靶标上的重叠或相似区域结合分子, 例如抗体。

[0049] 在一个实施方案中, 竞争性抑制测定中使用 HUVEC 或其他表达 $\alpha_5\beta_1$ 的细胞, 并且使用 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, 可在锥形管中洗涤 HUVEC 细胞并且以 1000rpm 旋转 5 分钟。典型地洗涤沉淀两次。随后, 可将细胞再悬浮, 计数且保持于冰上直至使用。可向孔中添加 $100 \mu\text{l}$ 第一抗 $\alpha_5\beta_1$ 抗体 (例如以 $1 \mu\text{g/ml}$ 浓度或更低浓度开始)。接着, 可向每一孔中添加 $100 \mu\text{l}$ (例如 20×10^5 个细胞) 细胞且于冰上孵育 30 分钟。接着, 可向各孔中添加 $100 \mu\text{l}$ 的结合生物素的抗 $\alpha_5\beta_1$ 抗体 ($5 \mu\text{g/ml}$ 储备液)

且于冰上孵育 30 分钟。随后洗涤细胞且在 1000rpm 下 5 分钟形成沉淀。吸出上清液。将与链霉亲和素 (streptavidin) (Jackson016-110-084) 缀合的 R-藻红素 (R-Phycoerythrin) 添加至孔中 (100 μ l, 以 1 : 1000)。接着,以箔包裹板且于冰上孵育 30 分钟。孵育后,可将沉淀洗涤且在 1000rpm 下 5 分钟形成沉淀。可使沉淀再悬浮并转移至微量滴定管中进行 FACS 分析。

[0050] “血管发生因子或血管发生物”是参与刺激血管发育,例如促进血管发生、内皮细胞生长、血管稳定性及 / 或血小管生成等的生长因子或其受体。例如,血管发生因子包括但不限于,例如 VEGF 和 VEGF 家族成员及其受体 (VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGFR1、VEGFR2 和 VEGFR3)、PDGF、PDGF 家族、纤维母细胞生长因子家族 (fibroblast growth factor family, FGFs)、TIE 配体 (血管生成素 (Angiopoietins)、ANGPT1、ANGPT2)、TIE1、TIE2、蝶素 (ephrins)、Bv8、Delta 样配体 4 (DLL4)、Del-1、纤维母细胞生长因子 (fibroblast growth factor) : (酸性 (aFGF) 和碱性 (bFGF)、FGF4、FGF9、BMP9、BMP10、卵泡抑素 (Follistatin)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、GM-CSF、肝细胞生长因子 (HGF) / 分散因子 (SF)、白介素 -8 (IL-8)、CXCL12、瘦素 (Leptin)、中期因子 (Midkine)、神经纤毛蛋白 (neuropilins)、NRP1、NRP2、胎盘生长因子、血小板衍生的内皮细胞生长因子 (PD-ECGF)、血小板衍生的生长因子,尤其 PDGF-BB、PDGFR- α 或 PDGFR- β 、多效生长因子 (Pleiotrophin, PTN)、前颗粒蛋白 (Progranulin)、增殖蛋白 (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)、A1k1、CXCR4、Notch1、Notch4、Sema3A、Sema3C、Sema3F、Robo4 等。其将进一步包括促进血管发生的因子,例如 ESM1 和珍珠素 (Perlecan)。其也将包括加速创伤愈合的因子,例如生长激素、类胰岛素生长因子 -I (IGF-I)、VIGF、表皮生长因子 (EGF)、EGF 样结构域 7 (EGF-like domain, multiple 7) (EGFL7)、CTGF 及其家族成员,和 TGF- α 及 TGF- β 。参见例如 Klagsbrun 和 D' Amore (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53 :217-39、Streit 及 Detmar (2003) *Oncogene* (癌基因) 22 :3172-3179、Ferrara 及 Alitalo (1999) *Nature Medicine* (自然医学) 5(12) : 1359-1364、Tonini 等人, (2003) *Oncogene* (癌基因) 22 :6549-6556 (例如列出了已知血管发生因子的表 1) ;和 Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8 :200-206。

[0051] “抗血管发生剂”或“血管发生抑制剂”是指直接或间接地抑制血管发生、血小管生成或不当的血管通透性的小分子量物质、多核苷酸 (包括例如抑制性 RNA (RNAi 或 siRNA))、多肽、分离的蛋白、重组蛋白、抗体或其缀合物或融合蛋白。应理解,抗血管发生剂包括结合血管发生因子或其受体并阻断其血管发生活性的那些药剂。例如,抗血管发生剂为如上所定义的血管发生剂的抗体或其他拮抗剂,例如 VEGF-A 或 VEGF-A 受体 (例如 KDR 受体或 Flt-1 受体) 的抗体、抗 PDGFR 抑制剂、阻断 VEGF 受体信号传导的小分子 (例如 PTK787/ZK2284、SU6668、**SUTENT®/SU11248** (苹果酸舒尼替尼 (sunitinib malate))、AMG706、或例如国际专利申请 W02004/113304 中所描述的那些)。抗血管发生剂包括,但不限于以下药剂 :VEGF 抑制剂 (例如 VEGF 特异性拮抗剂)、EGF 抑制剂、EGFR 抑制剂、**Erbibix®** (西妥昔单抗 (cetuximab), ImClone Systems, Inc., Branchburg, N. J.)、**Vectibix®** (帕尼单抗 (panitumumab), Amgen, Thousand Oaks, CA)、TIE2 抑制剂、IGF1R 抑制剂、COX-II (环加氧酶 II) 抑制剂、MMP-2 (基质 - 金属蛋白酶 2) 抑制剂、及 MMP-9 (基质 - 金属蛋白酶 9) 的抑制剂、CP-547, 632 (Pfizer Inc., NY, USA)、阿西替尼 (Axitinib)

(Pfizer Inc. AG-013736)、ZD-6474 (AstraZeneca)、AEE788 (Novartis)、AZD-2171、VEGF Trap (Regeneron/Aventis)、瓦他拉尼 (Vatalanib) (也称作 PTK-787、ZK-222584 Novartis & Schering A G)、Macugen (培加他尼八钠 (pegaptanib octasodium)、NX-1838、EYE-001, Pfizer Inc./Gilead/Eyetech)、IM862 (Cytran Inc., Kirkland, Wash., USA)、血管酶 (angiozyme), 一种来自 Ribozyme (Boulder, Colo.) 及 Chiron (Emeryville, Calif.) 的合成核酶, 及其组合。其他血管发生抑制剂包括血小板反应蛋白 1 (thrombospondin 1)、血小板反应蛋白 2、胶原蛋白 IV 及胶原蛋白 XVIII。VEGF 抑制剂披露于美国专利第 6, 534, 524 号以及第 6, 235, 764 号中, 两者均出于所有目的全文并入本文中。抗血管发生剂也包括天然血管发生抑制剂, 例如血管抑制素 (angiostatin)、内皮抑制素 (endostatin) 等。参见例如 Klagsbrun 及 D' Amore (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53 :217-39 ; Streit 及 Detmar (2003) *Oncogene* (癌基因) 22 :3172-3179 (例如列出对恶性黑素瘤的抗血管发生疗法的表 3) ; Ferrara 及 Alitalo (1999) *Nature Medicine* (自然医学) 5(12) :1359-1364 ; Tonini 等人, (2003) *Oncogene* (癌基因) 22 :6549-6556 (例如列出已知抗血管发生因子的表 2) ; 及 Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8 :200-206 (例如列出临床试验中使用的抗血管发生剂的表 1)。

[0052] 术语“抗血管发生疗法”是指适用于抑制血管发生的疗法, 其包含施用抗血管发生剂。

[0053] 在一实施方案中, 本发明的抗 VEGF 抗体的“Kd”或“Kd 值”是通过测定 Fab 对 VEGF 的溶液结合亲和力的以下分析来测定, 以抗体的 Fab 形式和 VEGF 分子进行的经放射性标记的 VEGF 结合测定 (RIA), 或者通过在未经标记的滴度系列的 VEGF 存在下, 使 Fab 与最小浓度的经 (¹²⁵I) 标记的 VEGF (109) 分子平衡, 随后通过抗 Fab 抗体包被的板捕捉结合的 VEGF 来测定 (Chen 等人, (1999) *J. Mol Biol* 293 :865-881)。为确立分析条件, 将微量滴定板 (microtiter plates) (Dynex) 以含 5ug/ml 的捕捉抗 Fab 抗体 (Cappel Labs) 的 50mM 碳酸钠 (pH9.6) 包被过夜, 随后在室温 (约 23°C) 下以含 2% (w/v) 的牛血清白蛋白的 PBS 封闭两小时至五小时。在非吸附性板 (Nunc#269620) 中, 将 100pM 或 26pM [¹²⁵I]VEGF (109) 与相关 Fab (例如 Fab-12 (Presta 等人, (1997) *Cancer Res.* (癌症研究) 57 :4593-4599)) 的连续稀释液混合。随后孵育相关 Fab 过夜; 然而, 持续孵育 65 小时以确保达到平衡。此后, 将混合物转移至捕捉板中以在室温下孵育 1 小时。接着去除溶液并用含 0.1% Tween-20 的 PBS 洗涤板 8 次。当板干燥时, 添加每孔 150ul 闪烁体 (MicroScint-20 ; Packard), 且以 Topcounty γ 计数器 (Packard) 对板计数 10 分钟。选择提供小于或等于 20% 最大结合的各 Fab 浓度用于竞争性结合测定。根据另一实施方案, 在 25°C 通过利用使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 的表面等离子共振测定, 使用约 10 响应单位 (RU) 的固定靶标分子 hVEGF (8-109) CM5 芯片来测定 Kd 或 Kd 值。简言之, 根据供货商的说明书用 N- 乙基 -N' -(3- 二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺盐酸盐 (EDC) 及 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化羧甲基化聚葡萄糖生物感应芯片 (CM5, BIAcore Inc.)。用 10mM 乙酸钠 (pH4.8) 将人 VEGF 稀释至 5 μg/ml (约 0.2 μM), 接着以每分钟 5 μl 的流动速率注射, 以得到大约 10 个响应单位 (RU) 的偶联蛋白。注射人 VEGF 后, 注射 1M 乙醇胺以阻断未反应的基团。为进行动力学测量, 在 25°C 下以大约 25 μl/min 的流动速率将 Fab 的两倍连续稀释液 (0.78nM 至 500nM) 注入含有 0.05% Tween 20 的 PBS (PBST) 中。使用简单的一对一朗

缪耳结合模型 (Langmuir binding model) (BIAcore 评估软件 3.2 版) 通过同时拟合结合与解离感应图 (sensorgram) 来计算结合速率 (k_{on}) 及解离速率 (k_{off})。以 k_{off}/k_{on} 比率的形式计算平衡解离常数 (Kd)。参见例如 Chen, Y. 等人, (1999) J. Mol Biol 293 :865-881。若根据上文表面等离子共振测定的结合速率超过 $10^6 M^{-1} S^{-1}$, 则结合速率可通过使用荧光淬灭技术如使用光谱仪, 例如装备有终止-流动的光谱仪 (Aviv Instruments) 或具有搅拌光析管的 8000 系列 SLM-Aminco 分光光度计 (ThermoSpectronic), 来测定在增加浓度的人 VEGF 截短形式 (8-109) 或小鼠 VEGF 存在下, 在 25°C 下 20nM 抗 VEGF 抗体 (Fab 形式) 的 PBS 溶液 (pH7.2) 的荧光发射强度 (激发 = 295nm, 发射 = 340nm, 16nm 带通) 增加或减低。可进行类似结合测定来测定抗 $\alpha 5 \beta 1$ Fab 或使用 $\alpha 5 \beta 1$ 作为靶标的抗体的 Kd。

[0054] 本文中所述的欲治疗的受试者为哺乳动物 (例如人类、非人类灵长类动物、大鼠、小鼠、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫等)。受试者可为临床患者、临床试验志愿者、实验动物等。受试者可能怀疑患有癌症、免疫疾病或具有异常血管发生的任何其他疾病, 或具有患该等疾病的风险; 可能经诊断患有癌症、免疫疾病或具有异常血管发生的任何其他疾病。本领域已知对于癌症、免疫疾病或表现出异常血管发生的任何其他疾病的许多诊断方法的此类疾病的临床描述。根据一实施方案, 根据本发明欲治疗的受试者为人类。

[0055] “异常血管发生”发生在新血管过度生长或在其他方面不当生长 (例如根据医学观点, 血管发生的位置、时序、程度或发生不当) 时的患病状态中或使产生患病状态。在一些情况下, 新血管生长存在时, 过度、不受控制或在其他方面不当的血管发生发生促进患病状态恶化或造成患病状态, 例如在癌症, 尤其血管形成性实体肿瘤 (vascularized solid tumors) 及转移性肿瘤 (metastatic tumors) (包括结肠 (colon) 癌、肺 (lung) 癌 (尤其小细胞肺癌 (small-cell lung cancer)) 或前列腺癌 (prostate cancer)); 由眼部新血管形成 (ocular neovascularisation) 引起的疾病, 尤其糖尿病性失明 (diabetic blindness)、视网膜病变 (retinopathies,)、主要是糖尿病性视网膜病变 (diabetic retinopathy) 或年龄相关的黄斑变性 (age-related macular degeneration)、脉络膜新血管形成 (choroidal neovascularization, CNV)、糖尿病性黄斑水肿 (diabetic macular edema)、病理性近视 (pathological myopia)、von Hippel-Lindau 病、眼睛组织浆菌病 (histoplasmosis of the eye)、中枢视网膜静脉阻塞 (Central Retinal Vein Occlusion, CRVO)、角膜新血管形成 (corneal neovascularization)、视网膜新血管形成及虹膜红变 (retinal neovascularization and rubeosis)、银屑病 (psoriasis)、银屑病性关节炎 (psoriatic arthritis)、血管母细胞瘤 (haemangioblastoma), 如血管瘤 (haemangioma)、炎性肾病 (inflammatory renal diseases), 如肾小球肾炎 (glomerulonephritis), 尤其是肾小球膜增生性肾小球肾炎 (mesangioproliferative glomerulonephritis)、溶血性尿毒综合征 (haemolytic uremic syndrome)、糖尿病性肾病 (diabetic nephropathy) 或高血压肾硬化 (hypertensive nephrosclerosis)、各种炎性疾病 (inflammatory diseases), 例如关节炎 (arthritis) 尤其类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis)、炎性肠病 (inflammatory bowel disease)、银屑病 (psoriasis)、结节病 (sarcoidosis)、动脉硬化 (arterial arteriosclerosis) 及移植后出现的疾病、子宫内膜异位 (endometriosis) 或慢性哮喘 (chronic asthma) 及超过 70 种其他病状中。新血管可供养患病组织, 破坏正常组织, 且在癌症的情况下, 新血管可允许肿瘤细胞逃逸至循环中且进驻其他器官中 (肿瘤

转移)。本发明涵盖治疗具有发生上述疾病的风险的那些患者。

[0056] “异常血管通透性”发生在血管与血管外隔区之间的液体流、分子（例如离子和营养物质）以及细胞（例如淋巴细胞）的流动过度或在其他方面不当（例如，根据医学观点血管通透性位置、时序、程度或发作不当）时的患病状态中或使产生患病状态。异常血管通透性可导致离子、水、营养物质或细胞通过血管结构的“渗漏”过度或在其他方面不当。在一些情况下，过度、不受控制或在其他方面不当的血管通透性或血管渗漏加剧或诱发疾病状态，包括例如与肿瘤相关的水肿，包括例如脑肿瘤、与恶性疾病相关的腹水、梅格斯综合征 (Meigs' syndrome)、肺部炎症、肾病综合征、心包积液、肋膜积液；与心血管疾病相关的通透性，例如心肌梗塞及中风后的病状及其类似疾病。本发明涵盖治疗已发生与异常血管通透性或渗漏相关的疾病及病症或具有患所述疾病及病症的风险的那些患者。

[0057] 作为接受本发明的抗体或多肽的候选者的其他患者患有以下疾病或具有患以下疾病的风险：纤维血管组织异常增生 (fibrovascular tissue)、红斑痤疮 (acne rosacea)、获得性免疫缺陷综合征 (acquired immune deficiency syndrome)、动脉阻塞 (artery occlusion bacterial ulcers)、异位性角膜炎 (atopic keratitis)、细菌性溃疡 (Bechets disease)、白塞病 (Bechets disease)、血源性肿瘤 (blood borne tumors)、颈动脉阻塞性疾病 (carotid obstructive disease)、脉络膜新血管形成 (choroidal neovascularization)、慢性炎症 (chronic inflammation)、慢性视网膜脱落 (chronic retinal detachment)、慢性葡萄膜炎 (chronic uveitis)、慢性玻璃体炎 (chronic vitritis)、接触镜过度磨损 (contact lens overwear)、角膜移植排斥 (corneal graft rejection)、角膜新血管形成 (corneal neovascularization)、角膜移植新血管形成 (corneal graft neovascularization)、局限性回肠炎 (Crohn' s disease)、伊尔斯病 (Eales disease)、流行性角膜结膜炎 (epidemic keratoconjunctivitis)、真菌性溃疡 (fungal ulcers)、单纯疱疹感染 (Herpes simplex infections)、带状疱疹感染 (Herpes zoster infections)、高粘度综合征 (hyperviscosity syndrome)、卡波西肉瘤 (Kaposi' s sarcoma)、白血病 (leukemia)、脂质变性 (lipid degeneration)、莱姆病 (Lyme' s disease)、边缘性角质层分离 (marginal keratolysis)、蚕食性角膜溃疡 (Mooren ulcer)、除麻风病外的分枝杆菌 (Mycobacteria) 感染、近视 (myopia)、眼部新血管性疾病 (ocular neovascular disease)、视窝 (optic pits)、奥斯勒韦伯综合征 (Osler-Weber syndrome)、(Osler-Weber-Rendu、骨关节炎 (osteoarthritis)、派杰病 (Pagets disease)、扁平部睫状体炎 (pars planitis)、类天疱疮 (pemphigoid)、疱性角结膜病 (phlyectenulosis)、多动脉炎 (polyarteritis)、激光后并发症 (post-laser complications)、原生动感染 (protozoan infections)、弹性纤维伪黄瘤 (pseudoxanthoma elasticum)、翼状胬肉 (pterygium)、干性角膜炎 (keratitis sicca)、放射状角膜切开术 (radial keratotomy)、视网膜新血管形成 (retinal neovascularization)、早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity)、晶状体后纤维组织增生 (retrolental fibroplasias)、结节病 (sarcoid)、巩膜炎 (scleritis)、镰状细胞贫血症 (sickle cell anemia)、舍格伦综合征 (Sogrens syndrome)、实体肿瘤 (solid tumors)、斯特格氏病 (Stargarts disease)、史蒂芬强生病 (Steven' s Johnson disease)、上边缘角膜炎 (superior limbic keratitis)、梅毒 (syphilis)、系统性红斑狼疮 (systemic lupus)、特荷安氏角膜边缘变性 (Terrien' s

marginal degeneration)、弓形体病 (toxoplasmosis)、外伤 (trauma)、尤文肉瘤 (tumors of Ewing sarcoma)、神经母细胞瘤 (tumors of neuroblastoma)、骨肉瘤 (tumors of osteosarcoma)、视网膜母细胞瘤 (tumors of retinoblastoma)、横纹肌肉瘤 (tumors of rhabdomyosarcoma)、溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis)、静脉阻塞 (vein occlusion)、维生素 A 缺乏 (Vitamin A deficiency) 及韦格纳结节病 (Wegeners sarcoidosis)、与糖尿病相关的不良血管发生 (undesired angiogenesis associated with diabetes)、寄生虫病 (parasitic diseases)、异常创伤愈合 (abnormal wound healing)、外科手术后肥大 (hypertrophy following surgery)、损伤或外伤 (injury 或 trauma)、毛发生长抑制、排卵及黄体形成抑制、植入抑制及子宫内胚胎发育抑制。

[0058] 抗血管发生疗法适用于下述各项的一般治疗：移植排斥反应 (graft rejection)、肺部炎症 (lung inflammation)、肾病综合征 (nephrotic syndrome)、子痫前症 (preeclampsia)、心包积液 (pericardial effusion) 例如与心包炎相关的心包积液、肋膜积液、特征为不良血管通透性或渗漏的疾病及病症，例如与包括例如脑肿瘤的肿瘤相关的水肿、与恶性疾病相关的腹水、梅格斯综合征 (Meigs' syndrome)、肺部炎症 (lung inflammation)、肾病综合征 (nephrotic syndrome)、心包积液 (pericardial effusion) 和肋膜积液 (pleural effusion)、与心血管疾病例如心肌梗塞及中风后病状及其类似疾病相关的通透性。

[0059] 根据本发明的其他血管发生相关性疾病包括血管纤维瘤 (angiofibroma) (易于出血的异常血管)、新血管性青光眼 (neovascular glaucoma) (眼中血管生长)、动静脉畸形 (arteriovenous malformations) (动脉与静脉之间异常连通)、不愈合骨折 (nonunion fractures) (不会愈合的骨折)、动脉粥样硬化斑 (atherosclerotic plaques) (动脉硬化)、化脓性肉芽肿 (pyogenic granuloma) (由血管构成的常见皮肤病变)、硬皮病 (scleroderma) (结缔组织疾病的一种形式)、血管瘤 (hemangioma) (由血管构成的肿瘤)、沙眼 (trachoma) (第三世界中失明的主要诱因)、血友病性关节 (hemophilic joints)、血管黏着及肥厚性疤痕 (vascular adhesions and hypertrophic scars) (异常疤痕形成)。

[0060] 本文中所用的“治疗”(及其语法变形如“treat”或“treating”)是指施用化合物或药物组合物用于预防及/或治疗目的。“治疗疾病”或用于“治疗性处理”是指向已患疾病的受试者施用治疗以改善受试者的病状。理想的治疗效果包括但不限于,预防疾病再发、减轻症状、减少疾病的任何直接或间接病理性后果、预防转移、降低疾病进展的速率、改善或减缓疾病状态,及症状缓解或预后改良。在一些实施方案中,本发明的抗体用于延迟疾病的发展或减缓疾病的进展。优选地,基于对下文所述任何特征性症状的鉴别或使用本文中所述的诊断方法,诊断受试者患具有异常血管发生的疾病。“预防疾病”是指对于尚未生病、但易患特定疾病或具有患特定疾病风险的受试者的预防性处理。优选地,使用本文中所述的诊断方法,确定受试者具有患具有异常血管发生的疾病的风险。

[0061] “治疗或改善”意指在病状发作前或后改善病状或病状的症状。如由任何标准技术所测定,比较等同的未经治疗的对照者,所述改善或治疗程度为至少 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 100%。

[0062] 术语“再发”、“复发”或“复发性”是指癌症或疾病在临床评定疾病消失后重现。远处转移或局部再发的诊断可视作复发。

[0063] “难治性”是指疾病或病状对于治疗有抗性或无反应（例如新生性浆细胞的数目即使在给予治疗后也增加）。在某些实施方案中，术语“难治性”是指对于任何先前治疗，包括但不限于，VEGF 拮抗剂、抗血管发生剂及化学疗法治疗有抗性或无反应。在某些实施方案中，术语“难治性”是指疾病或病状对于任何先前治疗，包含 VEGF 拮抗剂、抗血管发生剂及 / 或化学疗法治疗固有地无反应。在某些实施方案中，VEGF 拮抗剂为抗 VEGF 抗体。

[0064] “复发性”是指患者的疾病回归至其先前患病状态，尤其为在明显恢复或部分恢复后的症状重现。在某些实施方案中，复发性状态是指在先前治疗，包括但不限于 VEGF 拮抗剂、抗血管发生剂及 / 或化学疗法治疗之前重现疾病的过程或重现疾病。在某些实施方案中，复发状态是指在对癌症疗法，包含 VEGF 拮抗剂、抗血管发生剂及 / 或化学疗法治疗的初始强烈反应的后重现疾病的过程或重现疾病。在某些实施方案中，VEGF 拮抗剂为抗 VEGF 抗体。

[0065] 术语“辅助疗法”是指在主要疗法，通常外科手术，后给予治疗。癌症或疾病的辅助疗法可包括免疫疗法、化学疗法、放射疗法或激素疗法。

[0066] 术语“维持疗法”是指给予的帮助维持先前治疗效果的定期再治疗。通常给予维持疗法以帮助保持癌症消退或延长对特定疗法的反应，无论疾病是否进展。

[0067] 术语“侵袭性癌症”是指扩散至组织层以外开始进入正常周围组织中的癌症。侵袭性癌症可以是或也可以不是转移性的。

[0068] 术语“非侵袭性癌症”是指极早期癌症或未扩散至起源组织以外的癌症。

[0069] 肿瘤学中的术语“无进展存活”是指在治疗期间及治疗后，癌不生长的时间长度。无进展存活包括患者经历完全反应或部分反应的时间量，以及患者经历稳定疾病的时间量。

[0070] 肿瘤学中的术语“进展性疾病”可指自治疗开始起由于肿瘤质量增加或肿瘤中的扩散，肿瘤生长超过 20%。

[0071] “病症”是将受益于使用抗体治疗的任何状况。例如，哺乳动物患有或需要预防异常血管发生（过度、不当或不受控制的血管发生）或异常血管通透性或渗漏。包括慢性及急性病症或疾病，包括使哺乳动物易患所述病症的那些病理性状况。本文中欲治疗的病症的非限制性实例包括但不限于恶性及良性肿瘤、非白血病及淋巴恶性疾病、神经元、神经胶质、星形细胞、下丘脑及其他腺体、巨噬细胞、上皮、基质及囊胚腔病症；以及炎性、血管发生及免疫病症。

[0072] 术语“癌症”和“癌性”是指或描述特征通常为不受调节的细胞生长的哺乳动物生理学病状。癌症的实例包括但不限于，癌瘤 (carcinoma)、淋巴瘤 (lymphoma)、母细胞瘤 (blastoma)、肉瘤 (sarcoma) 和白血病 (leukemia)。这些癌症的更具体实例包括鳞状细胞癌 (squamous cell cancer)、成胶质细胞瘤 (glioblastoma)、子宫颈癌 (cervical cancer)、卵巢癌 (ovarian cancer)、肝癌 (liver cancer)、膀胱癌 (bladder cancer)、肝细胞瘤 (hepatoma)、乳腺癌 (breast cancer)、结肠癌 (colon cancer)、结肠直肠癌 (colorectal cancer)、子宫内膜癌 (endometrial carcinoma)、唾液腺癌 (salivary gland carcinoma)、肾癌 (kidney cancer)、肾脏癌 (renal cancer)、前列腺癌 (prostate cancer)、阴门癌 (vulval cancer)、甲状腺癌 (thyroid cancer)、肝癌 (hepatic carcinoma)、头颈部癌 (head and neck cancer)、直肠癌 (rectal cancer)、结肠直肠癌

(colorectal cancer)、肺癌 (lung cancer) 包括小细胞肺癌 (small-cell lung cancer)、非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer)、肺腺癌 (adenocarcinoma of the lung) 及肺鳞状癌 (squamous carcinoma of the lung)、鳞状细胞癌 (squamous cell cancer) (例如上皮鳞状细胞癌 (epithelial squamous cell cancer))、前列腺癌 (prostate cancer)、腹膜癌 (cancer of the peritoneum)、肝细胞癌 (hepatocellular cancer)、胃癌 (gastric or stomach cancer) 包括胃肠癌 (gastrointestinal cancer)、胰腺癌 (pancreatic cancer)、成胶质细胞瘤 (glioblastoma)、视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma)、星形细胞瘤 (astrocytoma)、卵泡膜细胞瘤 (thecomas)、卵巢男胚瘤 (arrhenoblastoma)、肝细胞瘤 (hepatoma)、血液科恶性疾病 (hematologic malignancies) 包括非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkins lymphoma, NHL)、多发性骨髓瘤 (multiple myeloma) 及急性血液科恶性疾病 (acute hematologic malignancies)、子宫内膜癌 (endometrial) 或子宫癌 (uterine carcinoma)、子宫内膜异位 (endometriosis)、纤维肉瘤 (fibrosarcomas)、绒膜癌 (choriocarcinoma)、唾液腺癌 (salivary gland carcinoma)、阴门癌 (vulval cancer)、甲状腺癌 (thyroid cancer)、食道癌 (esophageal carcinomas)、肝癌 (hepatic carcinoma)、肛门癌 (anal carcinoma)、阴茎癌 (penile carcinoma)、鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma)、喉癌 (laryngeal carcinomas)、卡波西肉瘤 (Kaposi' s sarcoma)、黑色素瘤 (melanoma)、皮肤癌 (skin carcinomas)、神经鞘瘤 (Schwannoma)、少枝胶质瘤 (oligodendroglioma)、神经母细胞瘤 (neuroblastomas)、横纹肌肉瘤 (rhabdomyosarcoma)、骨肉瘤 (osteogenic sarcoma)、平滑肌肉瘤 (leiomyosarcomas)、尿道癌 (urinary tract carcinomas)、甲状腺癌 (thyroid carcinomas)、威尔姆斯肿瘤 (Wilm' s tumor), 以及 B 细胞淋巴瘤 (B-cell lymphoma)) (包括低级 / 滤泡性非霍奇金淋巴瘤 (low grade/follicular non-Hodgkin' s lymphoma, NHL)、小淋巴球性 (small lymphocytic, SL) NHL、中级 / 滤泡性 (intermediate grade/follicular) NHL、中级弥漫性 (intermediate grade diffuse) NHL、高级免疫母细胞 (high grade immunoblastic) NHL、高级淋巴母细胞 (high grade immunoblastic) NHL、高级小型无裂细胞 (high grade small non-cleaved cell) NHL、巨大肿瘤 (bulky disease) NHL、套细胞淋巴瘤 (mantle cell lymphoma)、AIDS 相关淋巴瘤和瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症 (Waldenstrom' s Macroglobulinemia))、慢性淋巴球性白血病 (chronic lymphocytic leukemia CLL)、急性淋巴母细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL)、毛细胞白血病 (Hairy cell leukemia)、慢性骨髓母细胞白血病 (chronic myeloblastic leukemia) 和移植后淋巴组织增生病症 (post-transplant lymphoproliferative disorder, PTLD), 以及与母斑细胞病相关的异常血管增生 (abnormal vascular proliferation associated with phakomatoses), 及梅格斯综合征 (Meigs' syndrome)。

[0073] 本文中所使用的“肿瘤”是指恶性或良性的所有新生性细胞生长及增生, 以及所有癌前及癌性细胞及组织。

[0074] 术语“抗肿瘤组合物 (anti-neoplastic composition)”或“抗肿瘤剂 (anti-neoplastic agent)”是指适用于治疗癌症的包含至少一种活性治疗剂, 例如“抗癌剂”的组合物。治疗剂 (抗癌剂) 的实例包括但不限于, 例如化疗剂、生长抑制剂、细胞毒性剂、放射疗法中使用的药剂、抗血管发生剂、细胞凋亡剂、抗微管蛋白剂、及治疗癌症的其

他药剂,例如抗 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 (例如厄洛替尼 (erlotinib) (Tarceva™)、血小板衍生的生长因子抑制剂 (例如 Gleevec™ (甲磺酸伊马替尼 (Imatinib Mesylate)))、COX-2 抑制剂 (例如塞来考昔 (celecoxib))、干扰素、细胞激素、与一个或多个以下靶标 ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR- β 、BAFF、BR3、APRIL、BCMA 或 VEGF 受体结合的拮抗剂 (例如中和抗体)、TRAIL/Apo2 及其他生物活性及有机化学剂等。本发明中也涵盖其组合。

[0075] 本文中使用的“生长抑制剂”是指体外和 / 或体内抑制细胞生长或增生的化合物或组合物。因此,生长抑制剂可以是显著减少 S 期细胞百分比的药剂。生长抑制剂的实例包括阻断细胞周期进程 (S 期外的其他时期) 的药剂,例如诱导 G1 停滞和 M 期停滞的药剂。经典的 M 期阻断剂包括长春花属 (vincas) (长春新碱 (vincristine) 及长春碱 (vinblastine))、TAXOL® 和 topo II 抑制剂例如多柔比星 (doxorubicin)、表柔比星 (epirubicin)、柔红霉素 (daunorubicin)、依托泊苷 (etoposide) 及博来霉素 (bleomycin)。使 G1 停滞的药剂也连带引起 S 期停滞,例如 DNA 烷化剂,比如他莫昔芬 (tamoxifen)、泼尼松 (prednisone)、达卡巴嗪 (dacarbazine)、氮芥 (mechlorethamine)、顺铂 (cisplatin)、甲氨蝶呤 (metho-trexate)、5- 氟尿嘧啶及 ara-C。其他信息可见于 The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn 和 Israel 编,第 1 章,标题“Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs”, Murakami 等人, (WB Saunders: Philadelphia, 1995), 尤其第 13 页。

[0076] 本文中所述的术语“细胞毒性剂”是指抑制或阻止细胞功能和 / 或引起细胞破坏的物质。该术语意欲包括放射性同位素 (例如 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 及 Re^{186}) 生长抑制剂、化疗剂和毒素例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,或其片段。

[0077] “化疗剂”是适用于治疗癌症的化合物。化疗剂的实例包括适用于治疗癌症的化合物。化疗剂的实例包括:烷化剂,例如塞替派 (thiotepa) 和 CYTOXAN® 环磷酰胺 (cyclophosphamide), 烷基磺酸酯 (alkyl sulfonates) 如白消安 (busulfan)、英丙舒凡 (improsulfan) 和哌泊舒凡 (piposulfan); 吡丙啶类 (aziridines), 诸如苯佐替派 (benzodopa)、卡波醌 (carboquone)、美妥替派 (meturedopa) 和乌瑞替派 (uredopa); 乙撑亚胺类 (ethylenimines) 和甲基蜜胺类 (methylmelamines), 包括六甲蜜胺 (altretamine)、曲他胺 (triethylenemelamine)、三亚乙基磷酰胺 (triethylenephosphoramidate)、三乙烯硫代磷酸胺 (triethylenethiophosphoramidate) 和三羟甲蜜胺 (trimethylmelamine); 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 (bryostatin); callystatin; CC-1065 (包括其阿多来新 (adozelesin)、卡折来新 (carzelesin) 及比折来新 (bizelesin) 合成类似物); 隐藻素类 (cryptophycin) (特别是隐藻素 1 和隐藻素 8); 多拉司他汀 (dolastatin); 倍癌霉素 (duocarmycin) (包括合成类似物 KW-2189 及 CBI-TM1); 艾榴素 (eleutherobin); pancratistatin; 匍枝珊瑚醇 (sarcodictyin); 海绵素 (spongistatin); 氮芥 (nitrogen mustards) 例如苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、萘氮芥 (chlornaphazine)、胆磷酰胺 (cholophosphamide)、雌莫司汀 (estramustine)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、氮芥 (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);亚硝基脲类 (nitrosoureas) 例如卡莫司汀 (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,例如烯二炔类 (enediyne) 抗生素 (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)); 烯二炔蒽环类抗生素 (dynemicin), 包括烯二炔蒽环类抗生素 A (dynemicin A); 二膦酸盐类 (bisphosphonates), 诸如氯膦酸盐 (clodronate); 埃斯波霉素 (esperamicin); 以及新制癌菌素 (neocarzinostatin) 生色团和相关色素蛋白烯二炔类抗生素生色团)、阿克拉霉素 (aclacinomysins)、放线菌素 (actinomycin)、蒽霉素 (anthramycin)、偶氮丝氨酸 (azaserine)、博来霉素 (bleomycins)、放线菌素 C (cactinomycin)、carabycin、洋红霉素 (carminomycin)、嗜癌霉素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycinis)、放线菌素 D (dactinomycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸 (6-diazo-5-oxo-L-norleucine)、ADRIAMYCIN® 多柔比星 (doxorubicin) (包括吗啉代多柔比星 (morpholino-doxorubicin)、氰基吗啉代多柔比星 (cyanomorpholino-doxorubicin)、2-吡咯啉-多柔比星 (2-pyrrolino-doxorubicin) 和脱氧多柔比星 (deoxydoxorubicin))、表柔比星、依索比星 (esorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、马塞罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素类 (mitomycins) 诸如丝裂霉素 C、麦考酚酸 (mycophenolic acid)、诺拉霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycins)、培洛霉素 (peplomycin)、紫菜霉素 (porfiromycin)、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑霉素 (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, 诸如甲氨喋呤 (methotrexate) 和 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸 (denopterin)、甲氨喋呤 (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 (mercaptapurine)、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)、环硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾内酯 (testolactone); 抗肾上腺药 (anti-adrenals), 诸如氨鲁米特 (aminoglutethimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补偿剂, 诸如亚叶酸 (frolinic acid); 醋葡醛内酯 (aceglatone)、aldophosphamide glycoside、5-氨基酮戊酸 (aminolevulinic acid); 恩尿嘧啶 (eniluracil); 安吡啶 (amsacrine); bestrabucil; 比生群 (bisantrene); 依达曲沙 (edatraxate); 得弗伐胺 (defofamine); 秋水仙胺 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); 艾弗尼辛 (elfornithine); 依利醋铵 (elliptinium acetate); epothilone; 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓 (gallium nitrate); 羟基脲 (hydroxyurea); 香菇多糖 (lentinan); 氯尼达明 (lonidainine); 美坦生类化合物 (maytansinoids), 诸如美坦生 (maytansine)

和安丝菌素 (ansamitocins) ; 米托胍脘 (mitoguazone) ; 米托蒽醌 (mitoxantrone) ; 莫哌达醇 (mopidanmol) ; 尼曲吡啶 (nitraerine) ; 喷司他丁 (pentostatin) ; 异丙嗪 (phenamet) ; 吡柔比星 (pirarubicin) ; 洛索蒽醌 (losoxantrone) ; 鬼臼酸 (podophyllinic acid) ; 2-乙基酰肼 (2-ethylhydrazide) ; 丙卡巴肼 (procarbazine) ; **PSK®** 多糖复合物 (JHS 天然产物, Eugene, OR) ; 雷佐生 (razoxane) ; 利索新 (rhizoxin) ; 西佐喃 (sizofiran) ; 锗螺胺 (spirogermanium) ; 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid) ; 三亚胺醌 (triaziquone) ; 2,2',2''-三氯三乙胺 (2,2,2''-trichlorotriethylamine) ; 单端孢霉烯族毒素 (trichothecenes) (尤其 T-2 毒素、韦拉库林 A (verracurin A)、杆孢菌素 A (roridin A) 及 anguidine) ; 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 (arabinside) (“Ara-C”) ; 环磷酰胺 (cyclophosphamide) ; 塞替哌 (thiotepa) ; 紫杉烷类化合物 (taxoids), 例如 **TAXOL®** 紫杉醇 (paclitaxel) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.)、无克列莫佛 (Cremophor) 的 ABRAXANETM、紫杉醇的白蛋白改造的纳米颗粒制剂 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)、及 **TAXOTERE®** 多西他赛 (doxetaxel) (**Rhône-Poulenc** Rorer, Antony, France) ; 苯丁酸氮芥 (chlorambucil) ; **GEMZAR®** 吉西他滨 (gemcitabine) ; 6-硫鸟嘌呤 (thioguanine) ; 巯嘌呤 (mercaptopurine) ; 甲氨蝶呤 (methotrexate) ; 铂类似物, 例如顺铂和卡铂 (carboplatin) ; 长春碱 ; 铂 ; 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) ; 诺安托 (novantrone) ; 替尼泊苷 (teniposide) ; 依达曲沙 (edatrexate) ; 道诺霉素 (daunomycin) ; 胺基嘌呤 (aminopterin) ; 希罗达 (xeloda) ; 伊班膦酸盐 (ibandronate) ; 伊立替康 (Camptosar, CPT-11) (包括伊立替康与 5-FU 及亚叶酸 (leucovorin) 的治疗方案) ; 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000 ; 二氟甲基鸟氨酸 (difluoromethylornithine) (DMFO) ; 维甲类 (retinoids) 如视黄酸 (retinoic acid)、卡培他滨 (capecitabine)、考布他汀 (combretastatin)、亚叶酸 (LV) ; 奥沙利铂 (oxaliplatin), 包括奥沙利铂治疗方案 (FOLFOX) ; 降低细胞增生的 PKC- α 、Raf、H-Ras 和 EGFR 的抑制剂 (例如厄洛替尼 (TarcevaTM)) 及任何上述物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0078] 化疗剂也包括用以调控或抑制对肿瘤的激素作用的抗激素剂, 例如抗雌激素及选择性雌激素受体调节剂 (SERMs), 包括例如他莫昔芬 (包括 **NOLVADEX®** 他莫昔芬)、雷诺昔芬 (raloxifene)、屈洛昔芬 (droloxifene)、4-羟基他莫昔芬 (4-hydroxytamoxifen)、曲沃昔芬 (trioxifene)、keoxifene、LY117018、奥那司酮 (onapristone) 和法乐通·托瑞米芬 (FARESTON, toremifene) 抑制调控肾上腺中的雌激素产生的芳香酶的芳香酶抑制剂, 例如 4(5)-咪唑、氨基鲁米特 (aminoglutethimide)、**MEGASE®** 醋酸甲地孕酮 (megestrol acetate)、**AROMASIN®** 依西美坦 (exemestane)、福美坦 (formestane)、法徕唑 (fadrozole)、**RIVISOR®** 伏氯唑 (vorozole)、**FEMARA®** 来曲唑 (letrozole) 及 **ARIMIDEX®** 阿那曲唑 (anastrozole) 及抗雄激素, 例如氟他胺 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide)、比卡鲁胺 (bicalutamide)、亮丙立德 (leuprolide) 及戈舍瑞林

(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, 尤其那些抑制异常细胞增生所涉及的信号传导路径中的基因表达的, 例如 PKC- α 、Raf 及 H-Ras 核酶, 例如 VEGF 表达抑制剂 (例如 ANGIOZYME® 核酶) 及 HER2 表达抑制剂; 疫苗, 例如基因疗法疫苗, 例如 ALLOVECTIN® 疫苗; LEUVECTIN® 疫苗及 VAXID® 疫苗; PROLEUKIN® rIL-2; LURTOTECAN® 拓扑异构酶 1 抑制剂; ABARELIX® rmRH; 长春瑞滨 (Vinorelbine) 及 Esperamicins (参见美国专利第 4, 675, 187 号); 及任何上述物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0079] 本申请中所使用的术语“前药”指药物活性物质的前体或衍生物形式 (例如小分子), 该形式比起母体药物对患病细胞的细胞毒性小, 且能够酶促活化或转化成更具活性的母体形式。参见例如 Wilman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy” Biochemical Society Transactions, 14, 第 375-382 页, 615th Meeting Belfast (1986) 及 Stella 等人, “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,” Directed Drug Delivery, Borhardt 等人 (编), 第 247-267 页, Humana Press (1985)。本发明的前药包括但不限于, 含磷酸酯基的前药、含硫代磷酸酯基的前药、含硫酸酯基的前药、含肽的前药、D- 氨基酸修饰的前药、糖基化前药、含 β - 内酰胺的前药、含视情况经取代的苯氧基乙酰胺的前药或含视情况经取代的苯基乙酰胺的前药、5- 氟胞嘧啶及其他 5- 氟尿苷前药, 其可转化成更具活性的无细胞毒性药物。可衍生成用于本发明的前药形式的细胞毒性药物的实例, 包括但不限于, 上文所述的那些化疗剂。

[0080] “分离的”在用于描述本文中所披露的各种多肽时意指多肽已经鉴别且从表达其的细胞或细胞培养物中分离和 / 或回收。其天然环境的污染组分是通常会干扰多肽的诊断或治疗用途的物质, 可包括酶、激素及其他蛋白质或非蛋白质溶质。在实施方案中, 多肽应纯化至: (1) 足以通过使用旋转杯测序仪获得 N 末端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基的程度; 或 (2) 使用考马斯亮蓝 (Coomassie blue), 或优选地, 银染色剂在非还原或还原条件下通过 SDS-PAGE 获得均一性。由于多肽天然环境的至少一种组份将不存在, 所以经分离的多肽包括重组细胞内的原位多肽。然而, 通常经分离多肽将由至少一个纯化步骤来制备。

[0081] “分离”的编码多肽的核酸或其他编码多肽的核酸是经过鉴别并且自至少一种污染核酸分子分离的核酸分子, 其在编码多肽的核酸的天然来源中通常与污染核酸分子相缔合。经分离的编码多肽的核酸分子不同于自然界中所见的形式或定位。因此将经分离的编码多肽的核酸分子与天然细胞中所存在的特定的编码多肽的核酸分子相区分。然而, 经分离的编码多肽的核酸分子包括包含在通常表达多肽的细胞中的编码多肽的核酸分子, 其中例如核酸分子位于不同于天然细胞中的染色体位置的位置。

[0082] 术语“控制序列”是指在特定宿主生物体内表达的可操作地连接的编码序列所需的 DNA 序列。适于原核生物的控制序列例如包括启动子、视情况存在的操纵序列和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、聚腺苷酸化信号及增强子。

[0083] 当核酸与另一核酸序列功能相关时, 其即经是“可操作地连接”。比如, 若前序列或分泌性前导序列的 DNA 表达为参与多肽分泌的前体蛋白, 则其与所述多肽的 DNA 可操作地连接; 若启动子或强化子影响编码序列的转录, 则其与该序列可操作地连接; 或若核糖体结合位点为了便于翻译而定位, 则其与编码序列可操作地连接。一般而言, “可操作地连接”指所连接的 DNA 序列为相邻的, 且在分泌性前导序列的情况下为相邻的且处于阅读框

中。然而,增强子不必须是相邻的。连接通过在合适限制性位点处的连接来实现。若这些位点不存在,则根据常规操作使用合成寡核苷酸衔接子(adaptors)或接头(linkers)。

[0084] 本文中所定义的“严格条件”或“高严格条件”可由以下来鉴别:(1)采用低离子强度及高温进行洗涤,例如在 50℃下,0.015M 氯化钠 /0.0015M 柠檬酸钠 /0.1% 十二烷基硫酸钠;(2)在杂交期间采用例如甲酰胺的变性剂,例如在 42℃下,50% (v/v) 含有 0.1% 牛血清白蛋白的甲酰胺 /0.1% Ficoll/0.1% 聚乙烯吡咯啉酮 / 含有 750mM 氯化钠、75mM 柠檬酸钠的 50mM 磷酸钠缓冲液 (pH 6.5);或(3)在 42℃下在采用 50% 甲酰胺、5×SSC(0.75M NaCl、0.075M 柠檬酸钠)、50mM 磷酸钠 (pH 6.8)、0.1% 焦磷酸钠、5×丹哈特氏溶液 (Denhardt's solution)、声波处理的鲑鱼精 DNA (50 μg/ml)、0.1% SDS 及 10% 硫酸聚葡萄糖的溶液中杂交过夜,其中在 42℃下于 0.2×SSC (氯化钠 / 柠檬酸钠) 中洗涤 10 分钟,接着在 55℃下由含有 EDTA 的 0.1×SSC 组成的洗涤液中高严格洗涤 10 分钟。

[0085] 除非另有说明,否则本文中所述的氨基酸序列为相邻氨基酸序列。

[0086] 本文中所用的术语“免疫黏附素”表示具有异源蛋白(一种“黏附素”)的结合特异性与免疫球蛋白恒定结构域的效应子功能的抗体样分子。在结构上,免疫黏附素包含具有所需结合特异性的不被抗体的抗原识别及结合位点的(也即为“异源”)氨基酸序列与免疫球蛋白恒定结构域序列的融合。免疫黏附素分子的黏附部分通常是至少包含受体或配体(例如 VEGFR 或纤连蛋白配体)的结合位点的相邻氨基酸序列。免疫黏附素中的免疫球蛋白恒定结构域序列可获自任何免疫球蛋白,例如 IgG-1、IgG-2、IgG-3 或 IgG-4 亚型、IgA (包括 IgA-1 及 IgA-2)、IgE、IgD 或 IgM。通常,包含衍生自与免疫球蛋白的 Fc 部分融合的进行噬菌体展示选择所获得的特异结合靶标的序列的肽体,可被看作是本文中的免疫黏附素。

[0087] 术语“抗体”是以其最广义使用,且特定涵盖例如单克隆抗体(包括激动剂、拮抗剂及中和抗体)、具有多抗原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(参见下文),只要其特异性结合天然多肽和 / 或表现本发明的生物活性或免疫学活性即可。根据一个实施方案,抗体结合至靶蛋白的寡聚形式,例如三聚形式。根据另一实施方案,抗体特异性结合蛋白质,该结合可由本发明的单克隆抗体(例如本发明的保藏抗体等)抑制。短语抗体的“功能性片段或类似物”是具有与所提及抗体相同的定性生物活性的化合物。比如,本发明的抗体的功能性片段或类似物可以是可特异性结合至 VEGF 或 $\alpha 5 \beta 1$ 的。在一个实施方案中,抗体可阻止或基本上降低 VEGF 诱导细胞增生的能力。

[0088] “经分离抗体”为已经鉴别并且从其天然环境的组份分离和 / 或回收的抗体。其天然环境的污染组份是会干扰抗体的诊断或治疗用途的物质,且可包括酶、激素和其他蛋白质或非蛋白质溶质。在实施方案中,抗体应纯化至:(1)如通过 Lowry 法测定,以重量计大于 95% 的抗体,且优选以重量计大于 99%;(2)足以通过使用旋转杯测序仪获得 N 末端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基的程度;或(3)使用考马斯亮蓝或优选地银染色剂在还原或非还原条件下通过 SDS-PAGE 获得均一性。由于抗体的天然环境的至少一种组份将不存在,所以经分离抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而,经分离抗体通常将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0089] 基本 4 链抗体单元是由两条相同轻(L)链和两条相同重(H)链组成的异四聚体糖蛋白(IgM 抗体由 5 个基本异四聚体单元和被称为 J 链的另一多肽组成,因此含有 10 个抗原结合位点,而分泌型 IgA 抗体可聚合形成包含 2-5 个基本 4 链单元以及 J 链的多价集合

体)。对于 IgGs, 4 链单元通常为约 150,000 道尔顿。各 L 链通过一个共价二硫键连接至 H 链, 而根据 H 链同种型不同, 两条 H 链通过一或多个二硫键彼此连接。各 H 链及 L 链也具有规则间隔的链内二硫键。各 H 链在 N 端具有可变结构域 (V_H), 其后为各 α 链及 γ 链的三个恒定结构域 (C_H) 及 μ 和 ϵ 同型的四个 C_H 结构域。各 L 链在 N 端具有可变结构域 (V_L), 其后是位于其另一端的恒定结构域 (C_L)。 V_L 与 V_H 比对且 C_L 与重链的第一恒定结构域 (C_{H1}) 比对。认为特定氨基酸残基在轻链与重链可变结构域之间形成界面。 V_H 与 V_L 的配对共同形成单一抗原结合位点。关于不同种类抗体的结构及特性, 参见例如 BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (基础和临床免疫学), 第 8 版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr 和 Tristram G Parslow (编), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 第 71 页及第 6 章。

[0090] 来自任何脊椎动物物种的 L 链可基于其恒定结构域的氨基酸序列归为被称作 κ 及 λ 的两个明显不同类型之一。根据重链恒定结构域 (C_H) 的氨基酸序列不同, 免疫球蛋白可归于不同种类或同型。存在五种免疫球蛋白 IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM 分别具有称为 α , δ , γ , ϵ 和 μ 的重链。基于 C_H 序列及功能的相对较小的差异, 将 γ 及 α 类进一步分成亚类, 例如人类呈现以下亚类 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及 IgA2。

[0091] 术语“可变”是指在抗体中某些可变结构域区段在序列上极其不同。V 结构域介导抗原结合, 并且界定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而, 可变性并非均匀分布在可变结构域的 110 个氨基酸范围上。而是 V 区由 15-30 个氨基酸的相对不变段 (称作构架区 (FRs)) 由长度各为 9-12 个氨基酸的具有极大可变性的较短区域 (称作“高变区”) 间隔组成。天然重链合轻链的可变结构域各包含四个 FRs, 主要采用 β 桶构象, 由三个高变区连接, 其形成环连接, 且在一些情况下形成 β 折叠结构的一部分。各链中的高变区通过 FRs 紧密保持在一起, 并且与其他链的高变区一起促进抗体的抗原结合位点的形成 (参见 Kabat 等人, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST (免疫学目的的蛋白质序列), 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。虽然恒定结构域并不直接涉及于抗体与抗原的结合, 但其展现各种效应子功能, 例如使抗体参与抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。

[0092] 本文中所使用的术语“高变区”是指负责抗原结合的抗体氨基酸残基。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 中大约残基 24-34 (L1)、50-56 (L2) 及 89-97 (L3) 和 V_H 中大约残基 31-35B (H1)、50-65 (H2) 及 95-102 (H3) (在一实施方案中, H1 为大约 31-35); Kabat 等人, 同上) 和 / 或来自“高变环”的那些残基 (例如 V_L 中的残基 26-32 (L1)、50-52 (L2) 及 91-96 (L3) 及 V_H 中的残基 26-32 (H1)、53-55 (H2) 及 96-101 (H3); Chothia 及 Lesk, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 196 :901-917 (1987))。

[0093] 在本说明书及权利要求范围内, 当提及可变结构域中的残基时, 一般使用 Kabat 编号系统 (大约轻链中的残基 1-107 及重链中的残基 1-113) (例如 Kabat 等人, 同上 (1991))。当提及免疫球蛋白重链恒定区中的残基时, 一般使用“EU 编号系统”或“EU 指数” (例如 Kabat 等人, 同上 (1991) 中所报道的 EU 指数, 该文献以引用的方式明确并入本文中)。除非本文中另有说明, 否则提及抗体可变结构域中的残基编号意思是通过 Kabat 编号系统的残基编号。除非本文中另有说明, 否则提及抗体恒定结构域中的残基编号意谓通过 EU 编号系统的残基编号。

[0094] 本文中所用的术语“单克隆抗体”是指自实质上均一的抗体群落获得的抗体, 也即

构成所述群体的个别抗体除可少量存在的可能天然存在的突变外是相同的。单克隆抗体具有高特异性,是针对单一抗原位点。此外,与包括针对不同决定簇(抗原表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相比,各单克隆抗体是针对抗原上的单一决定簇。除特异性之外,单克隆抗体的优势还在于其可在不受其他抗体污染的情况下合成。修饰语“单克隆”不应理解为需要通过任何特定方法制造抗体。举例来说,适用于本发明中的单克隆抗体可通过首先由 Kohler 等人, Nature(自然), 256:495(1975) 描述的杂交瘤方法来制备,或可使用重组 DNA 方法在细菌、真核动物或植物细胞中制得(参见例如美国专利第 4,816,567 号)。也可以使用 Clackson 等人, Nature(自然), 352:624-628(1991); Marks 等人, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志), 222:581-597(1991) 中所述的技术或使用下文实施例中所描述的方法由噬菌体抗体文库分离“单克隆抗体”。

[0095] 本文中的单克隆抗体包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体种类或亚类的抗体中的相应序列一致或同源,而所述链的其余部分与源自另一物种或属于另一抗体种类或亚类的抗体中的相应序列一致或同源;以及这些抗体的片段,只要其表现出本发明的生物活性即可(参见美国专利第 4,816,567 号;和 Morrison 等人, PNAS USA, 81:6851-6855(1984))。本文中的相关嵌合抗体包括“灵长类动物化”抗体,其包含源自非人类灵长类动物(例如旧世界猴 (Old World Monkey)、猿等)的可变结构域抗原结合序列,和人类恒定区序列。

[0096] “亲和力成熟”抗体是在一或多个 CDR 中具有一或多种变化的抗体,与不具有那些变化的亲本抗体相比,那些变化使得抗体对抗原的亲和力改善。优选亲和力成熟抗体将对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔亲和力。亲和力成熟抗体是由本领域中已知的程序制备。Marks 等人, Bio/Technology 10:779-783(1992) 描述通过 VH 及 VL 结构域改组 (shuffling) 获得的亲和力成熟。CDR 和/或构架区残基的随机突变于下列文献中描述:Barbas 等人, PNAS USA 91:3809-3813(1994); Schier 等人, Gene(基因) 169:147-155(1995); Yelton 等人, J. Immunol. (免疫学杂志) 155:1994-2004(1995), Jackson 等人, J. Immunol. (免疫学杂志) 154(7):3310-9(1995); 及 Hawkins 等人, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 226:889-896(1992)。

[0097] “阻断性”抗体或“拮抗性”抗体是抑制或降低所结合抗原的生物活性的抗体。举例来说,阻断型或拮抗剂抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体通过结合 $\alpha 5\beta 1$ 而部分或完全地抑制血管发生。

[0098] “激动性”抗体是增强或增加所结合抗原的生物活性的抗体。举例来说,激动剂抗体抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体通过结合 $\alpha 5\beta 1$ 而增强血管发生。

[0099] “完整”抗体是包含抗原结合位点以及 C_L 及至少重链恒定结构域 C_{H1}、C_{H2} 及 C_{H3} 的抗体。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如人类天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。完整抗体优选具有一或多种效应子功能。

[0100] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选是完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 及 Fv 片段;双抗体;线性抗体(参见美国专利第 5,641,870 号,实施例 2; Zapata 等人, 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。

[0101] 表述“线性抗体”一般是指 Zapata 等人, Protein Eng., 8(10):1057-1062(1995) 中所述的抗体。简言之,这些抗体包含一对串联 Fd 区段 (VH-CH1-VH-CH1), 其与互补轻链多

肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性或单特异性的。

[0102] 用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个称为“Fab”片段的相同抗原结合片段；和一个残余“Fc”片段，该命名反映的容易结晶的能力。Fab 片段由完整 L 链连同 H 链的可变区域 (V_H) 及一个重链的第一恒定结构域 ($C_H 1$) 组成。各 Fab 片段对于抗原结合来说是单价的，也即其具有单一抗原结合位点。用胃蛋白酶处理抗体产生单一的大 $F(ab')_2$ 片段，其大致对应于具有二价抗原结合活性的两个二硫键连接的 Fab 片段并且仍能够与抗原交联。Fab' 片段不同于 Fab 片段之处在于，其在 $C_H 1$ 结构域的羧基端具有包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸的数个额外残基。Fab' -SH 在本文中指代恒定结构域半胱氨酸残基带有游离硫醇基的 Fab'。 $F(ab')_2$ 片段最初是中间具有铰链半胱氨酸的 Fab' 片段对的形式产生的。也已经知道抗体片段的其他的化学偶合。

[0103] Fc 片段包含通过二硫键保持在一起的两个 H 链的羧基端部分。抗体的效应子功能是由 Fc 区中的序列决定的，该区也是在某些类型细胞上发现的 Fc 受体 (FcR) 识别的部分。

[0104] “变异 Fc 区”包含由于至少一种如本文中所定义的“氨基酸修饰”而与天然序列 Fc 区的序列不同的氨基酸序列。优选地，与天然序列 Fc 区或亲本多肽的 Fc 区相比较，变异 Fc 区具有至少一个氨基酸置换，例如天然序列 Fc 区或亲本多肽的 Fc 区中约 1 至约 10 个氨基酸置换且优选约 1 至约 5 个氨基酸置换。在一个实施方案中，本文中的变异 Fc 区将与天然序列 Fc 区至少约 80% 同源、至少约 85% 同源、至少约 90% 同源、至少约 95% 同源、或至少约 99% 同源。根据另一实施方案，本文中的变异 Fc 区将与亲本多肽的 Fc 区至少约 80% 同源、至少约 85% 同源、至少约 90% 同源、至少约 95% 同源或至少约 99% 同源。

[0105] 术语“包含 Fc 区的多肽”是指例如抗体或免疫黏附素，包含 Fc 区的多肽（参见下文定义）。例如，在纯化多肽期间或通过重组工程改造编码多肽的核酸来移除 Fc 区的 C 端赖氨酸（根据 EU 编号系统残基 447）。因此，包含本发明的具有 Fc 区的多肽（包括抗体）的组合物可包含移除所有 K447 残基的多肽群体、未移除 K447 残基的多肽群体或包含有 K447 残基与无 K447 残基的多肽的混合物的多肽群体。

[0106] “Fv”是含有完整抗原识别位点及抗原结合位点的最小抗体片段。该片段由一个重链可变区域与一个轻链可变区域紧密、非共价缔合的二聚体组成。由者这两个结构域的折叠产生 6 个高变环（H 链及 L 链各产生 3 个环），所述高变环促进了氨基酸残基用于抗原结合并且赋予抗体以抗原结合特异性。然而，即使单一可变结构域（或仅包含三个对抗原特异的 CDR 的半个 Fv）也具有识别及结合抗原的能力，但其亲和力比完整结合位点低。

[0107] “单链 Fv”（也缩写为“sFv”或“scFv”）是包含连接成单一多肽链的 V_H 及 V_L 抗体结构域的抗体片段。sFv 多肽优选在 V_H 与 V_L 结构域之间进一步包含多肽连接子，使得 sFv 能够形成抗原结合所需的结构。关于 sFv 的评述，参见 Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies* (单克隆抗体药理学)，第 113 卷，Rosenburg 和 Moore 编，Springer-Verlag, New York, 第 269-315 页 (1994)；Borrebaeck 1995, 同下。

[0108] 术语“双抗体”是指通过在 V_H 结构域与 V_L 结构域之间使用短连接子（约 5-10 个残基）建构 sFv 片段（参见先前段落）以使得 V 结构域链之间而不是链内配对从而产生二价片段，也即具有两个抗原结合位点的片段，而制得的小抗体片段。双特异性双抗体是两个“交叉”sFv 片段的异二聚体，其中两个抗体的 V_H 及 V_L 结构域存在于不同多肽链上。双抗体于例如 EP404,097；WO 93/11161 及 Hollinger 等人，PNAS USA, 90:6444-6448 (1993) 中有

更详尽地描述。

[0109] “人源化”抗体是非人类（例如啮齿动物）抗体形式，其是含有源自非人类抗体的最小序列的嵌合抗体。在极大程度上，人源化抗体是来自接受者的高变区的残基经由具有所需抗体特异性、亲和力和能力的来自例如小鼠、大鼠、兔或非人类灵长类动物的非人类物种（供体抗体）的高变区的残基置换的人类免疫球蛋白（接受者抗体）。在一些情况下，人类免疫球蛋白的构架区（FR）残基经相应的非人类残基置换。此外，人源化抗体可以包含接受者抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步改善抗体效能。一般而言，人源化抗体将包含实质上所有的至少一个且通常两个可变结构域，其中所有的或者实质上所有的高变环对应于非人类免疫球蛋白的高变环，并且所有的或实质上所有的FR是人类免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体视情况也将包含免疫球蛋白恒定区（Fc）的至少一部分，通常人类免疫球蛋白恒定区的至少一部分。关于其他细节，参见 Jones 等人，*Nature*（自然）321 :522-525(1986) ;Riechmann 等人，*Nature*（自然）332 :323-329(1988) 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2 :593-596(1992)。

[0110] “物种依赖性抗体”是对来自第一哺乳动物物种的抗原的结合亲和力比其对与其同源物——来自第二哺乳动物物种的结合亲和力强的抗体。通常，物种依赖性抗体“特异性结合”至人类抗原（也即，结合亲和力（Kd）值不超过约 1×10^{-7} M、不超过约 1×10^{-8} M 或不超过约 1×10^{-9} M），但对来自第二非人类哺乳动物物种的该抗原同源物的结合亲和力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。物种依赖性抗体可以是如上定义的各种类型抗体中的任一种，但优选是人源化或人类抗体。

[0111] 在这些实施方案中，如由流式细胞分选（FACS）分析或放射免疫沉淀（RIA）测定，多肽、抗体、拮抗剂或组合物与“非靶”蛋白的结合程度将比多肽、抗体、拮抗剂或组合物与其特定靶蛋白的结合程度小约 10%。关于多肽、抗体、拮抗剂或组合物与靶分子的结合，术语“特异性结合”或“特异性结合至”特定多肽或特定多肽靶标上的抗原表位或者对特定多肽或特定多肽靶标上的抗原表位“具特异性”是指结合与非特异性相互作用具有可测量程度的差异。可以例如，通过与对照分子，一般是不具有结合活性的类似结构的分子的结合的比较，来测定分子的结合进而测量特异性结合。举例来说，可通过与类似于靶标的对照分子（例如过量的未经标记靶标）竞争来测定特异性结合。在此情况下，若经标记靶标与探针的结合由过量未经标记靶标竞争性抑制，则指示特异性结合。如本文中所述的术语“特异性结合”或“特异性结合至”特定多肽或特定多肽靶标上的抗原表位或对特定多肽或特定多肽靶标上的抗原表位“其特异性”可由例如分子对靶标的 Kd 是至少约 10^{-4} M、至少约 10^{-5} M、至少约 10^{-6} M、至少约 10^{-7} M、至少约 10^{-8} M、至少约 10^{-9} M、或者至少约 10^{-10} M、至少约 10^{-11} M、至少约 10^{-12} M 或更高来表现。在一实施方案中，术语“特异性结合”是指分子结合至特定多肽或特定多肽上的抗原表位而实质上不结合至任何其他多肽或多肽抗原表位的结合。

[0112] 抗体“效应子功能”是指可归因于抗体的 Fc 区（天然序列 Fc 区或氨基酸序列变异 Fc 区）的那些生物活性，且其随抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例包括 C1q 结合及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；细胞表面受体的下调；及 B 细胞活化。“天然序列 Fc 区”包含与自然界中发现的 Fc 区的氨基酸序列一致的氨基酸序列。Fc 序列的实例于例如，但不限于，Kabat 等人，同上（1991）中描述。

[0113] 关于本文中所鉴别的多肽及抗体序列的“氨基酸序列一致性百分比(%)”或“同源性”定义是在将任何保守性置换视作序列一致性的一部分对序列进行比对之后,候选序列中与经比较的多肽的氨基酸残基一致的氨基酸残基百分比。为测定氨基酸序列一致性百分比而进行的比对可以用本领域中的多种方式达成,例如使用可公开获得的计算机软件,例如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适合参数,包括在所比较序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。然而,为达成本文的目的,氨基酸序列一致性百分比值是使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 产生。ALIGN-2 序列比较计算机程序是由 Genentech, Inc. 编写且源代码已经与使用者文件一起归档于美国版权办公室 (U. S. Copyright Office, Washington D. C., 20559), 在其中其是以美国版权登记号 TXU510087 号登记。ALIGN-2 程序可以通过 Genentech, Inc. (South San Francisco, California) 公开获得。ALIGN-2 程序应经编译以用于 UNIX 操作系统, 优选数字 UNIX V4.0D。所有序列比较参数由 ALIGN-2 程序设定且不改变。

[0114] 术语“Fc 受体”或“FcR”是用于描述与抗体的 Fc 区结合的受体。在一个实施方案中,本发明的 FcR 是结合 IgG 抗体的 FcR(γ 受体)并且包括 Fc γ RI、Fc γ RII 及 Fc γ RIII 亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体及可变剪接形式。Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA (“活化受体”)及 Fc γ RIIB (“抑制受体”),其主要差异在其细胞质结构域的相似氨基酸序列。活化受体 Fc γ RIIA 的细胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的活化基元 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)。抑制受体 Fc γ RIIB 的细胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基元 (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, ITIM) (参见评述 M. in Daëron, Annu. Rev. Immunol. (免疫学年度综述) 15 :203-234(1997))。该术语包括异型,例如 Fc γ RIIIA 异型 Fc γ RIIIA-Phe158、Fc γ RIIIA-Val158、Fc γ RIIA-R131 和 / 或 Fc γ RIIA-H131。FcR 于 Ravetch 和 Kinet, Annu. Rev. Immunol. (免疫学年度综述) 9 :457-92(1991); Capel 等人, Immunomethods (免疫方法) 4 :25-34(1994); 和 de Haas 等人, J. Lab. Clin. Med. 126 :330-41(1995) 中评述。本文中的术语“FcR”涵盖其他 FcR 包括将来鉴别的那些 FcR。该术语也包括新生儿受体 FcRn, 其负责将母体 IgG 转移至胎儿 (Guyer 等人, J. Immunol. (免疫学杂志) 117 :587(1976) 及 Kim 等人, J. Immunol. (免疫学杂志) 24 :249(1994))。

[0115] 术语“FcRn”是指新生儿 Fc 受体 (FcRn)。FcRn 在结构上与主要组织相容性复合物 (MHC) 类似且由非共价结合至 β 2- 微球蛋白的 α 链组成。新生儿 Fc 受体 FcRn 的多种功能于 Ghetie 及 Ward(2000) Annu. Rev. Immunol. (免疫学年度综述) 18, 739-766 中评述。FcRn 在免疫球蛋白 IgG 自母体至幼体的被动传递及血清 IgG 水平的调控中发挥作用。FcRn 可充当救助受体,以完整形式结合并转运在细胞内以及横跨细胞的胞饮 IgG,且通过默认的降解途径将其援救。

[0116] W000/42072(Presta) 和 Shields 等人, J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 9(2) : 6591-6604(2001) 描述与 FcR 的结合改善或减少的抗体变体。那些公开的内容特定地以引用的方式并入本文中。

[0117] 人类 IgG Fc 区的“CH1 结构域”(也称作“H1”结构域的“C1”)通常从约氨基酸 118 延伸至约氨基酸 215(EU 编号系统)。

[0118] “铰链区”一般定义是从人类 IgG1 的 Glu216 延伸至 Pro230(Burton, Molec.

Immunol. (分子免疫学) 22 :161-206 (1985))。通过将形成重链间 S-S 键的第一个和最后一个的半胱氨酸残基置于相同位置可使其他 IgG 同种型的铰链区与 IgG1 序列比对。

[0119] Fc 区的“下部铰链区”通常定义为与铰链区的 C 端紧邻的残基段,也即 Fc 区的残基 233 至 239。在先前的报道中, FcR 结合一般是由于 IgG Fc 区下部铰链区中的氨基酸残基。

[0120] 人类 IgG Fc 区的“CH2 结构域”(也称作“H2”结构域的“C2”)通常自约氨基酸 231 延伸至约氨基酸 340。CH2 结构域的独特之处在于其并不与另一结构域紧密配对。而是两个 N 连接的分支糖链插入完整的天然 IgG 分子的两个 CH2 结构域之间。已推测糖类可提供结构域-结构域配对的替代并且帮助稳定 CH2 结构域。Burton, Molec. Immunol. (分子免疫学) 22 :161-206 (1985)。

[0121] “CH3 结构域”(也称作“C2”或“H3”结构域)包含 Fc 区中 CH2 结构域 C 端的残基段(也即约氨基酸残基 341 至抗体序列的 C 端,通常在 IgG 的氨基酸残基 446 或 447 处)。

[0122] “功能性 Fc 区”具有天然序列 Fc 区的效应子功能”。示例性的“效应子功能”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)的下调等。这些效应子功能一般需要 Fc 区与结合结构域(例如抗体可变结构域)组合并且可以例如使用如本文中所揭示的各种测定来评定。

[0123] “C1q”是包括免疫球蛋白的 Fc 区的结合位点的多肽。C1q 与两种丝氨酸蛋白酶 C1r 及 C1s 一起形成复合物 C1,其是补体依赖性细胞毒性(CDC)途径的第一组份。人类 C1q 可购自例如 Quidel, San Diego, CA。

[0124] 术语“结合结构域”是指结合至另一分子的多肽区域。在 FcR 的情况下,结合结构域可包含负责结合 Fc 区的其多肽链(例如其 α 链)的一部分。一种有用的结合结构域是 FcR α 链的细胞外结构域。

[0125] 具有拥有“改变”的 FcR 结合亲和力或 ADCC 活性的变异 IgG Fc 的抗体或肽体是与亲本多肽或包含天然序列 Fc 区的多肽相比,具有增强或减低的 FcR 结合活性(例如 Fc γ R 或 FcRn)和/或 ADCC 活性的抗体或肽体。“表现增加的结合”至 FcR 的变体的 Fc 以高于亲本多肽或天然序列 IgG Fc 的亲和力(例如表观 Kd 或 IC50 值较低)结合至少一种 FcR。根据一些实施方案,与亲本多肽相比,结合提高约 3 倍,优选约 5 倍、10 倍、25 倍、50 倍、60 倍、100 倍、150 倍、200 倍、250 倍、300 倍、350 倍、400 倍、450 倍或 500 倍,或结合提高约 25% 至 1000%。“表现减少的结合”至 FcR 的多肽变体以低于亲本多肽的亲和力(例如表观 Kd 或 IC50 值较高)结合至少一种 FcR。与亲本多肽相比,结合减少可以是约 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%或更多的结合减少。

[0126] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”指一种细胞毒性形式,其中分泌 Ig 与存在于某些细胞毒性细胞(例如自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞及巨噬细胞)上的 Fc 受体(FcR)结合,使这些细胞毒性效应细胞能够特异性结合至带有抗原的靶细胞,并且随后以细胞毒素杀死靶细胞。抗体“配备”细胞毒性细胞且绝对是该杀伤所需的。用于介导 ADCC 的初级细胞、NK 细胞仅表达 Fc γ RIII,而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 及 Fc γ RIII。FcR 在造血细胞上的表达总结于 Ravetch 和 Kinet, Annu. Rev. Immunol (免疫学年度综述) 9 :457-92 (1991) 第 464 页上的表 3 中。为评价相关分子的 ADCC 活性,可进行体外 ADCC

测定,例如美国专利第 5,500,362 号或第 5,821,337 号或下文实施例中所述的测定。适用于这些测定的效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 及自然杀伤 (NK) 细胞。或者,或另外,可体内,例如在例如 Clynes 等人,PNAS(USA)95:652-656(1998) 中所揭示的动物模型中评价相关分子的 ADCC 活性。

[0127] 当测定中具有变异 Fc 区的多肽与具有野生型 Fc 区的多肽(或亲本多肽)的量基本上相同时,与具有野生型 IgG Fc 的多肽或亲本多肽相比,在人类效应细胞存在下“表现增加的 ADCC”或更有效介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 的包含变异 Fc 区的多肽,是体外或体内实质上更有效介导 ADCC 的多肽。一般而言,这些变体将使用如本文中所揭示的体外 ADCC 测定来鉴别,但涵盖例如在动物模型等中测定 ADCC 活性的其他测定或方法。在一个实施方案中,优选变体在介导 ADCC 方面比野生型 Fc(或亲本多肽)有效约 5 倍至约 100 倍,例如约 25 倍至约 50 倍。

[0128] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指在补体存在下溶解靶细胞。经典补体活化途径是通过补体系统的第一组份 (C1q) 结合至与其同源抗原结合的(适当亚类的)抗体起始。为评定补体活化,可进行 CDC 测定,例如如 Gazzano-Santoro 等人, J. Immunol. Methods(免疫学方法杂志)202:163(1996) 中所述。

[0129] 具有已变化的 Fc 区氨基酸序列和增加或降低的 C1q 结合能力的多肽变体描述于美国专利第 6,194,551 号及 WO 99/51642 中。那些专利公开的内容特定地以引用的方式并入本文中。也参见 Idusogie 等人, J. Immunol. (免疫学杂志)164:4178-4184(2000)。

[0130] “人类效应细胞”是表达一个或多个 FcR 且执行效应子功能的白细胞。根据一个实施方案,所述细胞至少表达 Fc γ RIII, 并且执行 ADCC 效应子功能。介导 ADCC 的人类白细胞的实例包括外周血单核细胞 (PBMC)、自然杀伤 (NK) 细胞、单核细胞、细胞毒性 T 细胞及嗜中性粒细胞;其中 PBMC 及 NK 细胞较佳。效应细胞可自其天然来源分离,例如自如本文中所述的血液或 PBMC 分离。

[0131] 测量与 FcRn 的结合的方法是已知的(参见例如 Ghetie 1997, Hinton2004)。人类 FcRn 高亲和力结合多肽与人类 FcRn 的体内结合以及血清半衰期,可例如在表达人类 FcRn 的转基因小鼠或转染人类细胞系中测定,或在经施用 Fc 变异多肽的灵长类动物中测定。在一个实施方案中,特定的具有变异 IgG Fc 的本发明抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体,与具有野生型 IgG Fc 的多肽相比,表现出对人类 FcRn 的结合亲和力增加至少 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。在一特定实施方案中,对人类 FcRn 的结合亲和力增加约 170 倍。

[0132] 在一个实施方案中,关于对 FcRn 的结合亲和力,多肽的 EC50 或表观 Kd(在 pH 6.0) 小于 1 μ M, 优选地小于或等于 100nM, 更优选小于或等于 10nM。在一实施方案中,关于对 Fc γ RIII (F158, 也即低亲和力同种型) 增加的结合亲和力, EC50 或表观 Kd 小于或等于 10nM 且对于 Fc γ RIII (V158; 高亲和力同种型), EC50 或表观 Kd 小于或等于 3nM。根据另一实施方案,若测试抗体与对照抗体结合曲线的中点处吸光值的比率(例如 $A_{450nm(抗体)}/A_{450nm(对照抗体)}$) 小于或等于 40%, 则相对于对照抗体(例如 Herceptin® 抗体), 抗体与 Fc 受体结合的降低可看作相对于对照抗体显著。根据另一实施方案,若测试抗体与对照抗体结合曲线的中点处吸光值的比率(例如 $A_{450nm(抗体)}/A_{450nm(对照抗体)}$) 大于或等于 125%, 则相对于对照抗体(例如 Herceptin® 抗体), 抗体与 Fc 受体结合的增加可视为相对于对照抗体显

著。

[0133] “亲本多肽”或“亲本抗体”是包含满足以下的氨基酸序列的多肽或抗体：自该氨基酸序列产生的变异多肽或抗体，并且针对该氨基酸序列对变异多肽或抗体进行比较。通常亲本多肽或亲本抗体缺乏一个或多个本文中所揭示的 Fc 区修饰，且与本文中所揭示的多肽变体效应子功能不同。亲本多肽可包含天然序列 Fc 区或具有预先存在的氨基酸序列修饰（例如添加、缺失和 / 或置换）的 Fc 区。

[0134] 本发明抗体可源自噬菌体展示。本文中所用“文库”是指复数个抗体或抗体片段序列，或编码这些序列的核酸，所述序列在根据本发明方法引入这些序列中的变异氨基酸的组合方面不同。

[0135] “噬菌体展示”是使变异多肽以与衣壳蛋白的至少一部分以融合蛋白的形式展示于噬菌体（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可从随机化蛋白质变体的庞大文库中快速且有效地分选那些以高亲和力结合至靶抗原的序列。在噬菌体上的展示肽和蛋白质文库已经用来在数百万多肽中筛选具有特异性结合性质的多肽。多价噬菌体展示方法已用于通过与丝状噬菌体的基因 III 或基因 VIII 融合来展示小随机肽和小蛋白质。Wells 及 Lowman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* (当前结构生物学观点) 3: 355-362 (1992) 及其中所引用的参考文献。在单价噬菌体展示中，使蛋白质或肽文库融合至基因 III 或其一部分，在野生型基因 III 蛋白质存在下，以低程度表达，使得噬菌体颗粒展示融合蛋白的一个拷贝或不展示。相对于多价噬菌体而言，亲和力作用降低，因此分选基于固有配体亲和力，并且使用简化了 DNA 操作的噬菌粒载体。Lowman 及 Wells, *Methods: Acompanion to Methods in Enzymology* (方法：酶学方法手册), 3: 205-0216 (1991)。

[0136] “噬菌粒”是具有例如 ColE1 的细菌复制起点及噬菌体的基因区拷贝的质粒载体。噬菌粒可用于任何已知的噬菌体，包括丝状噬菌体和人字形噬菌体。质粒一般也将含有抗生素抗性的可筛选标志。克隆至这些载体中的 DNA 区段可以以质粒复制。当含有这些载体的细胞具有产生噬菌体颗粒所需的所有基因时，质粒的复制模式变为滚环复制 (rolling circle replication) 以产生质粒 DNA 的一条链的拷贝，且包装噬菌体颗粒。噬菌粒可形成感染性或非感染性噬菌体颗粒。该术语包括含有噬菌体衣壳蛋白基因或其片段的连接至异源多肽基因形成融合体，以使得所述异源多肽展示于噬菌体颗粒表面上的噬菌粒。

[0137] 术语“噬菌体载体”是指含有异源基因并且能够复制的噬菌体的双链复制形式。噬菌体载体具有允许噬菌体复制及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，例如 M13、f1、fd、Pf3 噬菌体或其衍生物；或 λ 形噬菌体，例如 λ 、21、phi80、phi81、82、424、434 等或其衍生物。

[0138] 多肽，例如肽体、免疫黏附素、抗体和短肽，的共价修饰包括在本发明的范围内。共价修饰的一种类型包括使多肽的靶向氨基酸残基与有机衍生物反应，该有机衍生物能够与多肽的所选的侧链或 N 端或 C 端残基反应。以双功能剂衍生适用于，例如将多肽和用于纯化抗体的方法中的水不溶性持基质或表面交联，并且反之亦然。常用交联剂包括例如 1,1-双(重氮乙酰基)-2-苯基乙烷、戊二醛、N-羟基-琥珀酰亚胺酯，例如与 4-叠氮基水杨酸形成的酯)、同质双官能酰亚胺酯，包括二琥珀酰亚胺基酯，例如 3,3'-二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)、双官能顺丁烯二酰亚胺，例如双-N-顺丁二烯二酰亚胺基-1,8-辛烷)及例如甲基-3-[(对叠氮基苯基)二硫基]丙酰亚胺酯的试剂。

[0139] 其他修饰包括谷氨酰胺酰基及天冬酰胺酰基残基分别脱酰胺化成相应谷氨酰基及天冬氨酰基残基；脯氨酸及赖氨酸的羟化；丝氨酰基或苏氨酰基残基的羟基的磷酸化；赖氨酸、精氨酸及组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化 [T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties (蛋白质: 结构和分子特性), W. H. Freeman & Co., San Francisco, 第 79-86 页 (1983)]；N 端氨的乙酰化；及任何 C 端羧基的酰胺化。

[0140] 其他修饰包括毒素与拮抗剂缀合，例如美坦生及美坦生类化合物、加利车霉素及其他细胞毒性剂。

[0141] 多肽的共价修饰的另一类型包含以美国专利第 4, 640, 835 号、第 4, 496, 689 号、第 4, 301, 144 号、第 4, 670, 417 号、第 4, 791, 192 号或第 4, 179, 337 号中所述的方式使多肽连接至多种非蛋白质聚合物，例如聚乙二醇 (PEG)、聚丙二醇或聚环氧烷之一。

[0142] 如果有利，也可以形成包含与另一异源多肽或氨基酸序列（例如免疫黏附素或肽体）融合的多肽的嵌合分子的方式来修饰本发明多肽。

[0143] 在一个实施方案中，该嵌合分子包含多肽与蛋白质转导结构域的融合体，其使用例如人类免疫缺陷病毒 TAT 蛋白的蛋白质转导结构域靶向多肽以传递至多个组织，并且更特定的穿过脑血障壁 (Schwarze 等人, 1999, *Science* (科学) 285 :1569-72)。

[0144] 在另一实施方案中，该嵌合分子包含多肽与标签多肽的融合体，标签多肽提供了抗标签抗体能够选择性结合的抗原表位。一般将抗原表位标签置于多肽的氨基端或羧基端。可使用针对标签多肽的抗体检测多肽的这些表位标签形式的存在。又，提供抗原表位标签使得多肽能够轻易地使用抗标签抗体或另一类型的结合至抗原表位标签的亲和力基质通过亲和纯化。本领域中已知多种标签多肽及其相应抗体。实例包括聚-组氨酸 (poly-His) 或聚-组氨酸-甘氨酸 (poly-His-gly)；flu HA 标签多肽及其抗体 12CA5 [Field 等人, *Mol. Cell. Biol.* (分子和细胞生物学), 8 :2159-2165 (1988)]；c-myc 标签及其 8F9、3C7、6E10、G4、B7 及 9E10 抗体 [Evan 等人, *Molecular and Cellular Biology* (分子和细胞生物学), 5 :3610-3616 (1985)]；及单纯性疱疹病毒糖蛋白 D(gD) 标签及其抗体 [Paborsky 等人, *Protein Engineering* (蛋白质工程), 3(6) :547-553 (1990)]。其他标签多肽包括 Flag-肽 [Hopp 等人, *BioTechnology* (生物技术), 6 :1204-1210 (1988)]；KT3 抗原表位肽 [Martin 等人, *Science* (科学), 255 :192-194 (1992)]； α -微管蛋白抗原表位肽 [Skinner 等人, *J. Biol. Chem.* (生物化学杂志), 266 :15163-15166 (1991)]；及 T7 基因 10 蛋白肽标签 [Lutz-Freyermuth 等人, *PNAS USA*, 87 :6393-6397 (1990)]。

[0145] 在一替代实施方案中，嵌合分子可包含多肽与免疫球蛋白或免疫球蛋白的特定区域的融合体。对于嵌合分子（例如“免疫黏附素”）的二价形式而言，该融合体可以是与 IgG 分子的 Fc 区的融合体。本发明的 Ig 融合体包括包含大约或仅人类残基 94-243、残基 33-53 或残基 33-52 替代 Ig 分子内的至少一个可变区的多肽。在一特定实施方案中，免疫球蛋白融合体包括 IgG1 分子的铰链、CH2 及 CH3 区，或铰链、CH1、CH2 及 CH3 区。关于免疫球蛋白融合体的制备，也参见美国专利第 5, 428, 130 号。

[0146] 本发明提供抑制或预防复发性肿瘤生长或复发性癌细胞生长的方法及组合物。在各种实施方案中，癌症是复发性肿瘤生长或复发性癌细胞生长，其中癌细胞数目未显著减少或已增多，或肿瘤尺寸未显著减小或已增大，或癌细胞尺寸未能有任何进一步减小或癌

细胞数目未能有任何进一步减少。可通过本领域中已知用于测定对癌细胞治疗的有效性的任何方法体内或体外确定癌细胞是否是复发性肿瘤生长或复发性癌细胞生长。对抗 -VEGF 治疗有抗性的肿瘤是复发性肿瘤生长的例子。

[0147] 本文中所揭示的多肽、抗体、拮抗剂或者组合物的“有效量”是足以实施特定的声称的目的的量。“有效量”可根据经验及通过关于所述目的的已知方法确定。

[0148] 术语“治疗有效量”是指本发明的抗体、多肽或拮抗剂可有效“治疗”哺乳动物 (aka 患者) 的疾病或病症的量。在癌症的情况下, 治疗有效量的药物可减少癌细胞的数目减小肿瘤尺寸或重量; 抑制 (也即, 在一定程度上减缓且优选终止) 癌细胞浸润至周边器官中; 抑制 (也即, 在一定程度上减缓且优选终止) 肿瘤转移; 在一定程度上抑制肿瘤生长; 和 / 或在一定程度上缓解与癌症相关的一或多种症状。对于药物可防止现有癌细胞生长和 / 或杀死现有癌细胞的程度而言, 药物可以是细胞生长抑制剂和 / 或细胞毒性剂。在一实施方案中, 治疗有效量是生长抑制量。在另一实施方案中, 治疗有效量是延长患者存活期的量。在另一实施例中, 治疗有效量是改善患者的无进展存活的量。

[0149] 在创伤愈合的情况下, 术语“有效量”或“治疗有效量”是指可以有效加速或改善受试者创伤愈合的药物量。治疗剂量是对患者表现治疗作用的剂量, 并且低于治疗剂量 (sub-therapeutic dose) 是对所治疗患者不表现治疗作用的剂量。

[0150] “慢性创伤”是指不愈合的创伤。参见例如 Lazarus 等人, Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing (评估创伤和评价愈合的定义和指南), Arch. Dermatol. 130 :489-93 (1994)。慢性创伤包括, 但不限于, 例如动脉溃疡 (arterial ulcers)、糖尿病性溃疡 (diabetic ulcers)、压力性溃疡 (pressure ulcers)、静脉溃疡 (venous ulcers) 等。急性创伤可发展成慢性创伤。急性创伤包括, 但不限于, 由例如热损伤、外伤、外科手术、大范围皮肤癌切除、深度真菌及细菌感染、血管炎 (vasculitis)、硬皮病 (scleroderma)、天疱疮 (pemphigus)、中毒性表皮坏死溶解 (toxic epidermal necrolysis) 等引起的创伤。参见例如 Buford, Wound Healing and Pressure Sores (创伤愈合和压力性疼痛), HealingWell.com, 出版于 2001 年 10 月 24 日。“普通创伤”是指经历普通创伤愈合修复的创伤。

[0151] 本发明多肽、抗体、拮抗剂或是组合物的“生长抑制量”是能够体外或体内抑制细胞, 尤其肿瘤, 例如癌细胞生长的量。可根据经验及通过已知方法或通过本文中所提供的实例来确定为抑制新生性细胞生长的本发明多肽、抗体、拮抗剂或组合物的“生长抑制量”。

[0152] 本发明多肽、抗体、拮抗剂或组合物的“细胞毒性量”是能够体外或体内引起细胞、尤其肿瘤例如癌细胞破坏的量。可根据经验及通过本领域中已知的方法来确定为抑制新生性细胞生长的本发明多肽、抗体、拮抗剂或组合物的“细胞毒性量”。

[0153] 本文中的“自身免疫病”是由受试者自身组织产生且针对受试者自身组织的疾病或病症, 或其共分离 (co-segregate) 或表现形式或由其产生的病状。自身免疫病或病症的例子包括, 但不限于: 关节炎 (arthritis) (类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis), 例如急性关节炎 (acute arthritis)、慢性类风湿性关节炎 (chronic rheumatoid arthritis)、痛风性关节炎 (gouty arthritis)、急性痛风性关节炎 (acute gouty arthritis)、慢性炎性关节炎 (chronic inflammatory arthritis)、退行性关节炎 (degenerative arthritis)、感染性关节炎 (infectious arthritis)、莱姆关节炎 (Lyme

arthritis)、增生性关节炎 (proliferative arthritis)、银屑病性关节炎 (psoriatic arthritis)、椎骨关节炎 (vertebral arthritis)、及青少年发作型类风湿性关节炎 (juvenile-onset rheumatoid arthritis)、骨关节炎 (osteoarthritis)、慢性渐进性关节炎 (arthritis chronica progrediente)、变形性关节炎 (arthritis deformans)、慢性原发性多发性关节炎 (polyarthritis chronica primaria)、反应性关节炎 (reactive arthritis)、及僵直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis)、炎症过增生性皮肤病 (inflammatory hyperproliferative skin diseases)、银屑病 (psoriasis) 例如斑块银屑病 (plaque psoriasis)、滴状银屑病 (guttate psoriasis)、脓疱性银屑病 (pustular psoriasis)、及指甲银屑病 (psoriasis of the nails)、皮炎 (dermatitis) 包括接触性皮炎 (contact dermatitis)、慢性接触性皮炎 (chronic contact dermatitis)、变应性皮炎 (allergic dermatitis)、变应性接触性皮炎 (allergic contact dermatitis)、疱疹样皮炎 (dermatitis herpetiformis) 及特应性皮炎 (atopic dermatitis)、x 连锁高 IgM 综合征 (x-linked hyper IgM syndrome)、荨麻疹 (urticaria) 例如慢性特发性荨麻疹 (chronic idiopathic urticaria)、包括慢性自身免疫性荨麻疹 (chronic autoimmune urticaria)、多发性肌炎 (polymyositis)/ 皮肌炎 (dermatomyositis)、青少年皮肌炎 (juvenile dermatomyositis)、中毒性表皮坏死松解症 (toxic epidermal necrolysis)、硬皮病 (scleroderma) 包括系统性硬皮病 (systemic scleroderma)、硬化症 (sclerosis) 例如系统性硬化症 (systemic sclerosis)、多发性硬化症 (multiple sclerosis) (MS) 例如脊髓-视觉 (spino-optical) MS、原发性进行性 (primary progressive) MS 及复发缓解型 (relapsing remitting) MS、进行性系统性硬化症 (progressive systemic sclerosis)、动脉粥样硬化 (atherosclerosis)、动脉硬化 (arteriosclerosis)、播散性硬化症 (sclerosis disseminata) 及共济失调性硬化症 (ataxic sclerosis)、炎症肠病 (inflammatory bowel disease) (IBD) (例如局限性回肠炎 (Crohn' s disease)、结肠炎 (colitis) 例如溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis)、溃疡性结肠炎 (colitis ulcerosa)、微观结肠炎 (microscopic colitis)、胶原性结肠炎 (collagenous colitis)、息肉状结肠炎 (colitis polyposa)、坏死性小肠结肠炎 (necrotizing enterocolitis) 及透壁性结肠炎 (transmural colitis)、及自身免疫性炎症性肠病 (autoimmune inflammatory bowel disease))、坏疽性脓皮病 (pyoderma gangrenosum)、结节性红斑 (erythema nodosum)、原发性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis)、巩膜外层炎 (episcleritis)、呼吸窘迫综合征 (respiratory distress syndrome) 包括成人或急性呼吸窘迫综合征 (adult or acute respiratory distress syndrome) (ARDS)、脑膜炎 (meningitis)、葡萄膜全部或部分发炎 (inflammation of all or part of the uvea)、虹膜炎 (iritis)、脉络膜炎 (choroiditis)、自身免疫性血液病症 (autoimmune hematological disorder)、类风湿性脊椎炎 (rheumatoid spondylitis)、突发性听力损失 (sudden hearing loss)、IgE 介导的疾病, 例如过敏反应 (anaphylaxis) 及变应性和特异性鼻炎 (allergic and atopic rhinitis)、脑炎 (encephalitis), 例如拉斯穆森氏脑炎 (Rasmussen' s encephalitis) 及边缘叶和 / 或脑干脑炎 (limbic and/or brainstem encephalitis)、葡萄膜炎 (uveitis), 例如前葡萄膜炎 (anterior uveitis)、急性前葡萄膜炎 (acute anterior uveitis)、肉芽肿性葡萄膜炎 (granulomatous uveitis)、非肉芽肿性

葡萄膜炎 (nongranulomatous uveitis)、晶体状抗原性葡萄膜炎 (phacoantigenic uveitis)、后葡萄膜炎 (posterior uveitis) 或自身免疫性葡萄膜炎 (autoimmune uveitis)、伴有及不伴有肾病综合征的肾小球肾炎 (glomerulonephritis (GN) with and without nephrotic syndrome), 例如慢性或急性肾小球肾炎 (chronic or acute glomerulonephritis), 例如原发性 (primary) GN、免疫介导的 (immune-mediated) GN、膜性 (membranous) GN (膜性肾病) (membranous nephropathy)、特发性膜性 (idiopathic membranous) GN、膜性增生性 (membranous proliferative) GN (MPGN) (包括 I 型及 II 型) 及快速进行性 (rapidly progressive) GN、过敏性病状 (allergic conditions)、过敏反应 (allergic reaction)、湿疹 (eczema), 包括过敏性或异位性湿疹 (allergic or atopic eczema)、哮喘 (asthma), 例如支气管哮喘 (asthma bronchiale, bronchial asthma) 及自身免疫性哮喘 (auto-immune asthma)、涉及 T 细胞浸润及慢性发炎反应的病状、慢性肺部发炎疾病 (chronic pulmonary inflammatory disease)、自身免疫性心肌炎 (autoimmune myocarditis)、白细胞黏附缺乏 (leukocyte adhesion deficiency)、系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus (SLE) or systemic lupus erythematoses) (SLE), 例如皮肤 (cutaneous) SLE、亚急性皮肤红斑狼疮 (subacute cutaneous lupus erythematosus)、新生儿狼疮综合征 (neonatal lupus syndrome) (NLE)、播散性红斑狼疮 (lupus erythematosus disseminatus)、狼疮 (lupus) (包括肾炎性 (nephritis)、大脑炎性 (cerebritis)、儿童性 (pediatric)、非肾脏性 (non-renal)、圆盘状 (discoid)、脱发性 (alopecia))、青少年发作型 (juvenile onset) (I 型) 糖尿病 (diabetes mellitus), 包括儿童胰岛素依赖性糖尿病 (pediatric insulin-dependent diabetes mellitus) (IDDM)、成人发作型糖尿病 (adult onset diabetes mellitus) (II 型糖尿病)、自身免疫性糖尿病 (autoimmune diabetes)、特发性尿崩症 (idiopathic diabetes insipidus)、与由细胞激素及 T 淋巴细胞介导的急性及迟发超敏性相关的免疫应答 (immune responses associated with acute and delayed hypersensitivity mediated by cytokines and T-lymphocytes)、结核病 (tuberculosis)、结节病 (sarcoidosis)、肉芽肿病 (granulomatosis), 包括淋巴瘤样肉芽肿病 (lymphomatoid granulomatosis)、韦格纳氏肉芽肿 (Wegener's granulomatosis)、颗粒性白细胞缺乏症 (agranulocytosis)、血管病 (vasculitides), 包括血管炎 (vasculitis), 包括大血管血管炎 (large vessel vasculitis) 包括风湿性多肌痛及巨细胞 (polymyalgia rheumatica and giant cell) (高安 (Takayasu's)) 动脉炎)、中等血管血管炎 (medium vessel vasculitis) (包括川崎病 (Kawasaki's disease) 及结节性多动脉炎 (polyarteritis nodosa)、微观多动脉炎 (microscopic polyarteritis)、CNS 血管炎 (vasculitis)、坏死性血管炎 (necrotizing)、皮肤血管炎 (cutaneous) 或超敏性血管炎 (hypersensitivity vasculitis)、系统性坏死性血管炎 (systemic necrotizing vasculitis) 及 ANCA 相关血管炎 (ANCA-associated vasculitis), 例如丘-施 (Churg-Strauss) 血管炎或综合征 (Churg-Strauss vasculitis or syndrome) (CSS)、颞动脉炎 (temporal arteritis)、再生障碍性贫血 (aplastic anemia)、自身免疫性再生障碍性贫血 (autoimmune aplastic anemia)、Coombs 阳性贫血 (Coombs positive anemia)、戴-布贫血 (Diamond Blackfan anemia)、溶血性贫血 (hemolytic anemia) 或免疫溶血性贫血 (immune hemolytic anemia)

(包括自身免疫性溶血性贫血 (autoimmune hemolytic anemia) (AIHA)、恶性贫血 (pernicious anemia (anemia perniciososa))、艾迪生病 (Addison' s disease)、单纯红细胞性贫血 (pure red cell anemia) 或发育不全 (aplasia) (PRCA))、因子 VIII 缺乏 (Factor VIII deficiency)、A 型血友病 (hemophilia A)、自身免疫性嗜中性粒细胞减少症 (autoimmune neutropenia)、全血球减少症 (pancytopenia)、白细胞减少症 (leukopenia)、涉及白细胞渗出 (leukocyte diapedesis) 的疾病、CNS 炎性疾病 (inflammatory disorders)、多器官损伤综合征 (multiple organ injury syndrome) 例如因败血症 (septicemia)、外伤或出血 (trauma or hemorrhage) 继发的多器官损伤综合征、抗原-抗体复合物介导的疾病、抗肾小球基底膜疾病 (anti-glomerular basement membrane disease)、抗磷脂抗体综合征 (anti-phospholipid antibody syndrome)、变应性神经炎 (allergic neuritis)、白塞病 (Bechet' s/Behcet' s disease)、卡斯尔曼综合征 (Castleman' s syndrome)、古德帕斯丘综合征 (Goodpasture' s syndrome)、Reynaud' s 综合征 (Reynaud' s syndrome)、舍格伦综合征 (Sjogren' s syndrome)、斯-约二氏综合征 (Stevens-Johnson syndrome)、类天疱疮 (pemphigoid), 例如大疱性类天疱疮 (pemphigoid bullous) 及皮肤类天疱疮 (skin pemphigoid)、天疱疮 (pemphigus) (包括寻常型天疱疮 (pemphigus vulgaris)、落叶型天疱疮 (pemphigus foliaceus)、黏膜类天疱疮 (pemphigus mucus-membrane pemphigoid) 及红斑性天疱疮 (pemphigus erythematosus))、自身免疫性多内分泌病 (autoimmune polyendocrinopathies)、莱特尔 (Reiter' s) 疾病或综合征、免疫复合物肾炎 (immune complex nephritis)、抗体介导性肾炎 (antibody-mediated nephritis)、慢性神经病 (chronic neuropathy), 例如 IgM 多发性神经病 (IgM polyneuropathies) 或 IgM 介导性神经病 (IgM-mediated neuropathy)、血小板减少症 (thrombocytopenia) (例如由心肌梗塞 (myocardial infarction) 患者发展而来) (包括血栓性血小板减少性紫癜 (thrombotic thrombocytopenic purpura) (TTP) 及自身免疫或免疫介导性血小板减少症 (autoimmune or immune-mediated thrombocytopenia), 例如特发性血小板减少性紫癜 (idiopathic thrombocytopenic purpura) (ITP) (包括慢性或急性 ITP))、睾丸及卵巢的自身免疫病, 包括自身免疫性睾丸炎及卵巢炎 (autoimmune orchitis and oophoritis)、原发性甲状腺功能低下 (primary hypothyroidism)、副甲状腺低能症 (hypoparathyroidism)、自身免疫性内分泌疾病, 包括甲状腺炎 (thyroiditis) 例如自身免疫性甲状腺炎 (autoimmune thyroiditis)、桥本病 (Hashimoto' s disease)、慢性甲状腺炎 (chronic thyroiditis) (桥本甲状腺炎 (Hashimoto' s thyroiditis))、或亚急性甲状腺炎 (subacute thyroiditis)、自身免疫性甲状腺疾病 (autoimmune thyroid disease)、特发性甲状腺功能低下 (idiopathic hypothyroidism)、格雷夫斯病 (Grave' s disease)、多腺体综合征 (polyglandular syndromes) 例如自身免疫性多腺体综合征 (或多腺体内分泌病综合征)、副肿瘤综合征 (paraneoplastic syndromes), 包括神经性副肿瘤综合征 (neurologic paraneoplastic syndromes), 例如兰伯特-伊顿肌无力综合征 (Lambert-Eaton myasthenic syndrome) 或伊顿-兰伯特综合征 (Eaton-Lambert syndrome))、僵人综合征 (stiff-man or stiff-person syndrome)、脑脊髓炎 (encephalomyelitis), 例如变应性脑脊髓炎 (allergic encephalomyelitis or encephalomyelitis allergica) 及实验性变应性脑脊

髓炎 (experimental allergic encephalomyelitis) (EAE)、重症肌无力 (myasthenia gravis)、小脑变性 (cerebellar degeneration)、神经性肌强直 (neuromyotonia)、眼阵挛-肌阵挛综合征 (opsoclonus or opsoclonus myoclonus syndrome) (OMS), 及感觉神经病 (sensory neuropathy)、希恩综合征 (Sheehan' s syndrome)、自身免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis)、慢性肝炎 (chronic hepatitis)、狼疮状肝炎 (lupoid hepatitis)、巨细胞肝炎 (giant cell hepatitis)、慢性活动性肝炎 (chronic active hepatitis) 或自身免疫性慢性活动性肝炎 (autoimmune chronic active hepatitis)、淋巴间质肺炎 (lymphoid interstitial pneumonitis)、阻塞性细支气管炎 (非移植) 对 NSIP (bronchiolitis obliterans (non-transplant) vs NSIP)、吉兰-巴雷综合征 (Guillain-Barré syndrome)、贝格尔病 (Berger' s disease) (IgA 肾病)、特发性 IgA 肾病 (idiopathic IgA nephropathy)、线性 IgA 皮肤病 (linear IgA dermatosis)、原发性胆汁性肝硬化 (primary biliary cirrhosis)、肺硬变 (pneumonocirrhosis)、自身免疫性肠病综合征 (autoimmune enteropathy syndrome)、乳糜泻 (Celiac disease)、腹腔疾病 (Coeliac disease)、乳糜泻 (麸质性肠病) (celiac sprue (gluten enteropathy))、难治性口炎性腹泻 (refractory sprue)、特发性口炎性腹泻 (idiopathic sprue)、冷球蛋白血症 (cryoglobulinemia)、肌萎缩性侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis) (ALS; 卢·盖里格病 (Lou Gehrig' s disease))、冠状动脉疾病 (coronary artery disease)、自身免疫性内耳疾病 (autoimmune inner ear disease) (AIED)、或自身免疫性听力损失 (autoimmune hearing loss)、眼阵挛肌阵挛综合征 (opsoclonus myoclonus syndrome) (OMS)、多软骨炎 (polychondritis), 例如难治性或复发性多软骨炎、肺泡蛋白沉积症 (pulmonary alveolar proteinosis)、淀粉样变性 (amyloidosis)、巩膜炎 (scleritis)、非癌性淋巴细胞增多症 (non-cancerous lymphocytosis)、原发性淋巴细胞增多症 (primary lymphocytosis), 其包括单克隆 B 细胞淋巴细胞增多症 (monoclonal B cell lymphocytosis) (例如良性单克隆丙种球蛋白病 (benign monoclonal gammopathy) 和意义未明的单克隆丙种球蛋白病 (monoclonal gammopathy of undetermined significance) (MGUS))、外周神经病 (peripheral neuropathy)、副肿瘤综合征 (paraneoplastic syndrome)、离子通道病 (channelopathies), 例如癫痫 (epilepsy)、偏头痛 (migraine)、心律不齐 (arrhythmia)、肌肉病症 (muscular disorders)、耳聋 (deafness)、失明 (blindness)、周期性麻痹 (periodic paralysis) 及 CNS 离子通道病 (channelopathies)、自闭症 (autism)、炎性肌病 (inflammatory myopathy)、局部区段性肾小球硬化 (focal segmental glomerulosclerosis) (FSGS)、内分泌眼病 (endocrine ophthalmopathy)、葡萄膜视网膜炎 (uveoretinitis)、脉络膜视网膜炎 (chorioretinitis)、自身免疫性肝脏科病症 (autoimmune hepatological disorder)、肌肉纤维疼痛 (fibromyalgia)、多发性内分泌衰竭 (multiple endocrine failure)、施密特综合征 (Schmidt' s syndrome)、肾上腺炎 (adrenalitis)、胃萎缩 (gastric atrophy)、初老期痴呆 (presenile dementia)、脱髓鞘病 (demyelinating diseases), 例如自身免疫性脱髓鞘病 (autoimmune demyelinating diseases)、糖尿病性肾病 (diabetic nephropathy)、心肌梗死后综合征 (Dressler' s syndrome)、斑秃 (alopecia areata)、CREST 综合征 (钙质沉着症 (calcinosis)、雷诺现象 (Raynaud' s phenomenon)、食道蠕动

异常 (esophageal dysmotility)、指端硬化 (sclerodactyly) 及毛细血管扩张 (telangiectasia)、男性及女性自身免疫性不孕症 (male and female autoimmune infertility)、混合结缔组织疾病 (mixed connective tissue disease)、恰加斯病 (Chagas' disease)、风湿热 (rheumatic fever)、反复流产 (recurrent abortion)、农民肺 (farmer' s lung)、多形性红斑 (erythema multiforme)、心切开术后综合征 (post-cardiotomy syndrome)、库欣综合征 (Cushing' s syndrome)、鸟爱好者肺 (bird-fancier' s lung)、变应性肉芽肿性血管炎 (allergic granulomatous angiitis)、良性淋巴细胞血管炎 (benign lymphocytic angiitis)、奥尔波特综合征 (Alport' s syndrome)、肺泡炎 (alveolitis), 例如过敏性肺泡炎 (allergic alveolitis) 及纤维化肺泡炎 (fibrosing alveolitis)、间质性肺病 (interstitial lung disease)、输血反应 (transfusion reaction)、麻风病 (leprosy)、痢疾 (malaria)、利什曼体病 (leishmaniasis)、锥虫病 (kypanosomiasis)、血吸虫病 (schistosomiasis)、蛔虫病 (ascariasis)、曲霉病 (aspergillosis)、萨姆普特氏综合征 (Sampter' s syndrome)、卡布兰综合征 (Caplan' s syndrome)、登革热 (dengue)、心内膜炎 (endocarditis)、心内膜心肌纤维化 (endomyocardial fibrosis)、弥漫性间质性肺纤维化 (diffuse interstitial pulmonary fibrosis)、间质性肺纤维化 (interstitial lung fibrosis)、特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis)、囊肿性纤维化 (cystic fibrosis)、眼内炎 (endophthalmitis)、持久性隆起性红斑 (erythema elevatum et diutinum)、胎儿红血球母细胞增多症 (erythroblastosis fetalis)、嗜酸性筋膜炎 (eosinophilic faciitis)、舒尔曼综合征 (Shulman' s syndrome)、费尔蒂氏综合征 (Felty' s syndrome)、丝虫病 (flariasis)、睫状体炎 (cyclitis), 例如慢性睫状体炎 (chronic cyclitis)、异时性睫状体炎 (heterochronic cyclitis)、虹膜睫状体炎 (iridocyclitis) 或富克斯睫状体炎 (Fuch' s cyclitis)、亨诺赫-舍恩莱茵紫癜 (Henoch-Schonlein purpura)、人类免疫缺乏病毒 (HIV) 感染、艾柯病毒感染 (echovirus infection)、心肌病 (cardiomyopathy)、阿尔茨海默病 (Alzheimer' s disease)、小病毒感染 (parvovirus infection)、风疹病毒感染 (rubella virus infection)、疫苗接种后综合征 (post-vaccination syndromes)、先天性风疹感染 (congenital rubella infection)、埃巴病毒感染 (Epstein-Barr virus infection)、流行性腮腺炎 (mumps)、埃文斯综合征 (Evan' s syndrome)、自身免疫性性腺衰竭 (autoimmune gonadal failure)、西登哈姆氏舞蹈病 (Sydenham' s chorea)、链球菌感染后肾炎 (post-streptococcal nephritis)、阻塞血栓性血管炎 (thromboangitis ubiterans)、甲状腺中毒症 (thyrotoxicosis)、脊髓痨 (tabes dorsalis)、脉络膜炎 (chorioiditis)、巨细胞多肌痛 (giant cell polymyalgia)、内分泌眼病 (endocrine ophthamopathy)、慢性过敏性肺炎 (chronic hypersensitivity pneumonitis)、干燥性角膜结膜炎 (keratoconjunctivitis sicca)、流行性角膜结膜炎 (epidemic keratoconjunctivitis)、特发性肾脏综合征 (idiopathic nephritic syndrome)、微小肾病变 (minimal change nephropathy)、良性家族性及局部缺血再灌注损伤 (benign familial and ischemia-reperfusion injury)、视网膜自身免疫性 (retinal autoimmunity)、关节炎 (joint inflammation)、支气管炎 (bronchitis)、慢性阻塞性气道疾病 (chronic obstructive airway disease)、硅肺 (silicosis)、口疮 (aphthae)、阿

弗他性口腔炎 (aphthous stomatitis)、动脉硬化病症 (arteriosclerotic disorders)、无精子产生症 (aspermogenesis)、自身免疫性溶血 (autoimmune hemolysis)、结节病 (Boeck' s disease)、冷球蛋白血症 (cryoglobulinemia)、迪皮特朗挛缩 (Dupuytren' s contracture)、晶状体过敏性眼内炎 (endophthalmitis phacoanaphylactica)、过敏性肠炎 (enteritis allergica)、麻风结节性红斑 (erythema nodosum leprosum)、特发性面神经麻痹 (idiopathic facial paralysis)、慢性疲劳综合征 (chronic fatigue syndrome)、风湿热 (febris rheumatica)、哈-里综合征 (Hamman-Rich' s disease)、感觉神经性听力损失 (sensoneural hearing loss)、阵发性血红素尿 (haemoglobinuria paroxysmatica)、性腺低能症 (hypogonadism)、区域性回肠炎 (ileitis regionalis)、白细胞减少症 (leucopenia)、传染性单核细胞增多症 (mononucleosis infectiosa)、横断性脊髓炎 (transverse myelitis)、原发性特发性黏液水肿 (primary idiopathic myxedema)、肾病 (nephrosis)、交感性眼炎 (ophthalmia sympathica)、肉芽肿性睾丸炎 (orchitis granulomatosa)、胰腺炎 (pancreatitis)、急性多神经根炎 (polyradiculitis acuta)、坏疽性膜皮病 (pyoderma gangrenosum)、奎汶氏甲状腺炎 (Quervain' s thyroiditis)、后天性脾萎缩 (acquired splenic atrophy)、归因于抗精子抗体的不孕症 (infertility due to antispermatozoan antibodies)、非恶性胸腺瘤 (non-malignant thymoma)、白斑病 (vitiligo)、SCID 及埃巴病毒相关疾病 (SCID and Epstein-Barr virus-associated diseases)、获得性免疫缺陷综合征 (acquired immune deficiency syndrome) (AIDS)、寄生虫疾病 (parasitic diseases), 例如利什曼原虫病 (Leishmania)、中毒性休克综合征 (toxic-shock syndrome)、食物中毒 (food poisoning)、涉及 T 细胞浸润的病症 (conditions involving infiltration of T cells)、白细胞黏附缺乏 (leukocyte-adhesion deficiency)、与由细胞因子及 T 淋巴细胞介导的急性及迟发过敏性相关的免疫反应、涉及白细胞渗出 (leukocyte diapedesis) 的疾病、多器官损伤综合征 (multiple organ injury syndrome)、抗原-抗体复合物介导的疾病、抗肾小球基底膜疾病 (antiglomerular basement membrane disease)、变应性神经炎 (allergic neuritis)、自身免疫性多内分泌病 (autoimmune polyendocrinopathies)、卵巢炎 (oophoritis)、原发性黏液水肿 (primary myxedema)、自身免疫性萎缩性胃炎 (autoimmune atrophic gastritis)、交感性眼炎 (sympathetic ophthalmia)、风湿病 (rheumatic diseases)、混合结缔组织疾病 (mixed connective tissue disease)、肾病综合征 (nephrotic syndrome)、胰岛炎 (insulinitis)、多发性内分泌衰竭 (polyendocrine failure)、外周神经病 (peripheral neuropathy)、I 型自身免疫性多腺综合征 (autoimmune polyglandular syndrome type I)、成人发作型特发性副甲状腺低能症 (adult-onset idiopathic hypoparathyroidism) (A0IH)、全秃 (alopecia totalis)、扩张型心肌病 (dilated cardiomyopathy)、后天性表皮分解性水疱症 (epidermolysis bullosa acquisita) (EBA)、血色素沉着症 (hemochromatosis)、心肌炎 (myocarditis)、肾病综合征 (nephrotic syndrome)、原发性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis)、化脓性或非化脓性鼻窦炎 (purulent or nonpurulent sinusitis)、急性或慢性鼻窦炎 (acute or chronic sinusitis)、筛窦、额窦、上颌窦或蝶窦的鼻窦炎 (ethmoid, frontal, maxillary, or sphenoid sinusitis)、嗜酸性粒细胞相关病症 (eosinophil-related disorder), 例如嗜酸性细胞增

多症 (eosinophilia)、肺浸润嗜酸细胞增多症 (pulmonary infiltration eosinophilia)、嗜酸细胞增多-肌痛综合征 (eosinophilia-myalgia syndrome)、吕弗勒综合征 (Loffler's syndrome)、慢性嗜酸细胞性肺炎 (chronic eosinophilic pneumonia)、热带肺部嗜酸细胞增多症 (tropical pulmonary eosinophilia)、支气管肺炎曲霉病 (bronchopneumonic aspergillosis)、曲霉肿 (aspergilloma) 或含有嗜酸粒细胞的肉芽肿 (granulomas containing eosinophils)、过敏反应 (anaphylaxis)、血清反应阴性的脊椎关节病 (seronegative spondyloarthritides)、多发性内分泌自身免疫病 (polyendocrine autoimmune disease)、硬化性胆管炎 (sclerosing cholangitis)、巩膜、巩膜外层、慢性粘膜皮肤念珠菌病 (sclera, episclera, chronic mucocutaneous candidiasis)、布鲁顿综合征 (Bruton's syndrome)、婴儿期暂时性低丙种球蛋白血症 (transient hypogammaglobulinemia of infancy)、维斯科特-奥尔德里奇综合征 (Wiskott-Aldrich syndrome)、共济失调毛细血管扩张症 (ataxia telangiectasia)、与胶原病有关的自身免疫性病症、风湿 (rheumatism)、神经性疾病 (neurological disease)、局部缺血性再灌注病症 (ischemic re-perfusion disorder)、血压降低反应 (reduction in blood pressure response)、血管功能障碍 (vascular dysfunction)、血管扩张 (antgiectasis)、组织损伤 (tissue injury)、心血管缺血 (cardiovascular ischemia)、痛觉过敏 (hyperalgesia)、大脑缺血 (cerebral ischemia)、及伴随有血管形成的疾病 (disease accompanying vascularization)、过敏性病症 (allergic hypersensitivity disorders)、肾小球肾炎 (glomerulonephritides)、再灌注损伤 (reperfusion injury)、心肌或其他组织的再灌注损伤 (reperfusion injury of myocardial or other tissues)、具有急性发炎成分的皮肤病 (dermatoses with acute inflammatory components)、急性化脓性脑膜炎 (acute purulent meningitis) 或其他中枢神经系统炎性病症 (central nervous system inflammatory disorders)、粒细胞输血相关综合征 (granulocytettransfusion-associated syndromes)、细胞因子诱发的毒性 (cytokine-induced toxicity)、急性重度炎症 (acute serious inflammation)、慢性难治性炎症 (chronic intractable inflammation)、肾盂炎 (pyelitis)、肺硬变 (pneumonocirrhosis)、糖尿病性视网膜病变 (diabetic retinopathy)、糖尿病性大动脉病症 (diabetic large-artery disorder)、动脉内增生 (endarterial hyperplasia)、消化性溃疡 (peptic ulcer)、瓣膜炎 (valvulitis) 及子宫内膜异位症 (endometriosis)。

[0154] 术语“检测”意欲包括测定物质的存在与否或对物质的量进行定量。因此该术语是指使用本发明的材料、组合物及方法来进行定性和定量测定。一般来说,用于检测的特定技术对于本发明的实施并不关键。

[0155] 举例来说,根据本发明“检测”可包括:观察 $\alpha 5$ 基因产物、 $\beta 1$ 基因产物 (例如 mRNA 分子),或“ $\alpha 5$ ”或“ $\alpha 5 \beta 1$ ”多肽存在与否;“ $\alpha 5$ ”或“ $\alpha 5 \beta 1$ ”多肽水平或与靶标结合量的变化; $\alpha 5$ 或 $\alpha 5 \beta 1$ 多肽生物功能/活性的变化。在一些实施方案中,“检测”可包括检测野生型 $\alpha 5$ 或 $\alpha 5 \beta 1$ 水平 (例如 mRNA 或多肽水平)。检测可以包括定量任何值与对照相比较时至少约 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100% 或更多的变化 (例如增加或降低)。检测可包括定量任何值的至少约 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍或更高,例如 20

倍、30 倍、4- 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍、100 倍或更高的变化。

[0156] 本文中所使用的“标记物”是指直接或间接结合至抗体的可检测化合物或组合物。标记物自身可通过其自身检测（例如放射性同位素标记物或荧光标记物），或在酶促标记物的情况下，可以催化底物化合物或组合物的可检测的化学变化。

[0157] III. 抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体

[0158] 本文中提供可结合人类 $\alpha 5\beta 1$ 且竞争性抑制抗 $\alpha 5\beta 1$ 18C12 抗体与人类 $\alpha 5\beta 1$ 的结合的抗体。因此，本发明的一个实施方案提供了包含 SEQ ID NOS :2、3、4、5、6、7 或 8 中任一个可变轻链 (VL) 序列和 SEQ ID NOS :9、10、11、12、13 或 14 中任一个可变重链 (VH) 序列的抗体。也涵盖本文中所述抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体的人类或嵌合（包括例如人源化）形式抗体。

[0159] 根据一个实施方案，抗体以介于 500nM 与 1pM 之间的 Kd 结合人类 $\alpha 5\beta 1$ 。在某些实施方案中，本文中所提供的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ （例如 10^{-8}M 或以下，例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ，例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M ）的解离常数 (Kd)。根据另一实施方案，抗体不结合 $\alpha V\beta 3$ 或 $\alpha V\beta 5$ 或 $\alpha V\beta 1$ 。根据另一实施方案，抗体包含人类 IgG，例如人类 IgG1 或人类 IgG4 的 Fc 序列。在另一实施方案中，Fc 序列已经改变或变化以使得其缺乏抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 效应子功能，其通常与其与 Fc 受体 (FcRs) 的结合有关。存在许多可以改变效应子功能的 Fc 序列变化或突变的实例。举例来说，WO 00/42072 及 Shields 等人，J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 9(2) :6591-6604 (2001) 描述与 FcR 的结合提高或降低的抗体变体。那些公开的内容特定地以引用的方式并入本文中。抗体可以是 Fab、Fab'、F(ab)'₂、单链 Fv (scFv)、Fv 片段，以及双抗体和线性抗体形式。又，抗体可以结合至 $\alpha 5\beta 1$ 且是 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗剂，但也结合一种或多种其他靶标并抑制其功能（例如 VEGF）的多特异性抗体，或是结合至 $\alpha 5\beta 1$ 上的两个或两个以上不同位点的多特异性抗体。抗体可偶联治疗剂（例如细胞毒性剂、放射性同位素及化疗剂）或结合通过成像检测患者样品中或体内的 $\alpha 5\beta 1$ 的标记物（例如放射性同位素、荧光染料和酶）。

[0160] 也涵盖编码抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体的核酸分子、包含编码一个或两个可变结构域的核酸分子的表达载体和包含所述核酸分子的细胞。这些抗体可用于本文中所述的疗法中并且用以检测患者样品中（例如使用 FACS、免疫组织化学 (IHC)、ELISA 测定）或患者体内的 $\alpha 5\beta 1$ 蛋白。

[0161] A. 单克隆抗体

[0162] 单克隆抗体可例如使用杂交瘤方法（例如 Kohler 及 Milstein, Nature (自然), 256 :495 (1975) 所述的方法）制备，或可通过重组 DNA 方法（美国专利第 4, 816, 567 号）制得，或可通过下文实例中的本文所述方法产生。在杂交瘤方法中，仓鼠、小鼠或其他适当宿主动物通常经免疫剂（例如单独或与适合载体组合的 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 或 $\alpha 5\beta 1$ 多肽）免疫以引出产生或能够产生将特异性结合至该免疫剂的抗体的淋巴细胞。或者，淋巴细胞可经体外免疫。

[0163] 免疫剂典型地包括相关蛋白质的多肽或融合蛋白或包含该蛋白质的组合物。一般而言，若需要人类来源的细胞，则使用外周血淋巴细胞（“PBLs”）；或若需要非人类哺乳动物来源，则使用脾细胞或淋巴细胞。随后使用合适的融合剂，例如聚乙二醇，将淋巴细胞与永生细胞系融合以形成杂交瘤细胞。Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES :PRINCIPLES AND PRACTICE (单克隆抗体 :原理和实践) (New York :Academic Press, 1986), 第 59-103 页。

永生细胞系通常是经转化的哺乳动物细胞,尤其是啮齿动物、牛及人类来源的骨髓瘤细胞。通常采用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。可将杂交瘤细胞在合适的培养基中培养,其优选含有一种或多种抑制未融合的永生细胞生长或存活物质。举例来说,若亲本细胞缺乏酶——次黄嘌呤鸟嘌呤焦磷酸核糖转移酶(HGPRT 或 HPRT),则杂交瘤的培养基通常将包括次黄嘌呤、氨基蝶呤及胸苷(“HAT 培养基”),该物质阻止 HGPRT 缺陷细胞的生长。

[0164] 优选的永生细胞系是有效融合、支持通过所选择的抗体产生细胞稳定地高水平表达抗体,并且对例如 HAT 培养基的培养基敏感的细胞系。更优选的永生细胞系是鼠骨髓瘤细胞系,其可获自例如 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California 及美国菌种保存中心(American Type Culture Collection, Manassas, Virginia)。用于产生人类单克隆抗体的人类骨髓瘤及小鼠-人类融合骨髓瘤细胞系也已经被描述。Kozber, J. Immunol. (免疫学杂志), 133 :3001 (1984) ;Brodeur 等人 MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION TECHNIQUES AND APPLICATIONS(单克隆抗体产生技术和应用)(Marcel Dekker, Inc. :New York, 1987), 第 51-63 页。

[0165] 随后可在培养杂交瘤细胞的培养基中测定针对多肽的单克隆抗体的存在。可通过免疫沉淀或通过体外结合测定,例如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)测定由杂交瘤细胞所产生的单克隆抗体的结合特异性。本领域中这些技术和测定是已知的。可例如通过 Munson 及 Pollard, Anal. Biochem., 107 :220 (1980) 的 Scatchard 分析来测定单克隆抗体的结合亲和力。

[0166] 在鉴别出所需杂交瘤细胞之后,可通过有限稀释法使克隆形成亚克隆并通过标准方法使其生长。Goding, 同上。适合于实现此目的的培养基包括例如杜贝卡氏改良依格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)和 RPMI-1640 培养基。或者,可使杂交瘤细胞在哺乳动物体内以腹水形式进行体内生长。

[0167] 由亚克隆分泌的单克隆抗体可通过例如蛋白 A-琼脂糖、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析等常规免疫球蛋白纯化程序自培养基或腹水中分离或纯化。

[0168] 也可通过例如美国专利第 4, 816, 567 号中描述的重组 DNA 方法制得单克隆抗体。可使用常规程序(例如通过使用能够与编码鼠类抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)轻易地分离并测序编码本发明单克隆抗体的 DNA。本发明的杂交瘤细胞作为该 DNA 的优选来源。经分离后,可将 DNA 置于表达载体中,随后将表达载体转染至不另外产生免疫球蛋白的宿主细胞(例如猿 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞)中,以在重组宿主细胞内获得单克隆抗体的合成。也可以例如通过以人类重链和轻链恒定结构域的编码序列替代同源鼠序列(美国专利第 4, 816, 567 号;Morrison 等人, 同上),或通过将非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或部分共价结合至免疫球蛋白编码序列来修饰 DNA。该非免疫球蛋白多肽可替代本发明抗体的恒定结构域,或可替代本发明抗体的一个抗原结合位点的可变结构域以产生嵌合二价抗体。

[0169] 抗体可以是单价抗体。本领域中已经知晓制备单价抗体的方法。举例来说,一种方法涉及免疫球蛋白轻链和经修饰重链的重组表达。一般重链在 Fc 区中的任一点截短以防止重链交联。或者,相关半胱氨酸残基经另一氨基酸残基置换或缺失以防止交联。

[0170] 体外方法也适于制备单价抗体。可使用但不限于,本领域中已知的技术来实现抗体的消化来制备其片段,尤其 Fab 片段。

[0171] B. 人类抗体

[0172] 在某些实施方案中,本文中所提供的抗体是人类抗体。可使用本领域中已知的各种技术来制备人类抗体。人类抗体一般描述于 van Dijk 和 van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* (当前药学观点) 5 :368-74(2001) 以及 Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* (当前免疫学观点) 20 :450-459(2008)。

[0173] 可通过向已经经过修饰因而对于抗原攻击刺激产生完整人类抗体或具有人类可变区的完整抗体的转基因动物施用免疫原,来制备人类抗体。这些动物通常含有全部或部分人类免疫球蛋白基因座,其替代了内源免疫球蛋白基因座,或存在于染色体外或随机整合于动物染色体内。在这些转基因小鼠中,内源免疫球蛋白基因座一般已经不活化。关于从转基因动物获得人类抗体的方法的综述,参见 Lonberg, *Nat. Biotech.* (自然生物技术) 23 :1117-1125(2005)。也参见例如描述 XENOMOUSE™ 技术的美国专利第 6,075,181 号及第 6,150,584 号;描述 HUMAB® 技术的美国专利第 5,770,429 号;描述 K-M MOUSE® 技术的美国专利第 7,041,870 号;及描述 VELOCIMOUSE® 技术的美国专利申请公开文本第 US 2007/0061900 号。这些动物产生的完整抗体的人类可变区可进一步修饰,例如通过与不同人类恒定区组合。

[0174] 人类抗体也可通过基于杂交瘤的方法制得。用于产生人类单克隆抗体的人类骨髓瘤及小鼠-人类融合骨髓瘤细胞系已经描述。(参见例如 Kozbor *J. Immunol.* (免疫学杂志), 133 :3001(1984) Brodeur 等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* (单克隆抗体产生技术及应用), 第 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 和 Boerner 等人, *J. Immunol.* (免疫学杂志), 147 :86(1991)) 通过人类 B 细胞杂交瘤技术产生的人类抗体也在 Li 等人, *PNAS. USA*, 103 :3557-3562(2006) 中描述。其他方法包括例如美国专利第 7,189,826 号(描述由杂交瘤细胞系产生单克隆人类 IgM 抗体)及 Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4) :265-268(2006) (描述人类-人类杂交瘤) 中所述的那些方法。人类杂交瘤技术 (Trioma 技术) 也于 Vollmers 和 Brandlein, *Histology and Histopathology* (组织学和组织病理学), 20(3) :927-937(2005); 及 Vollmers 和 Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* (实验和临床药学方法和发现), 27(3) :185-91(2005) 中描述。

[0175] 也可通过分离选自源自人类噬菌体展示文库的 Fv 克隆可变结构域序列产生人类抗体。随后可将这些可变结构域序列与所需人类恒定结构域组合。下文描述自抗体文库选择人类抗体的技术。

[0176] C. 源自文库的抗体。

[0177] 可通过在组合文库中筛选具有所需活性的抗体来分离本发明抗体。举例来说,本领域中已知多种用于产生噬菌体展示文库并且在这些文库中筛选具有所需结合特征的抗体的方法。这些方法于例如 Hoogenboom 等人, *Methods in Molecular Biology* (分子生物学方法) 178 :1-37(0' Brien 等人编, Human Press, Totowa, NJ, 2001) 中评述,并且进一步于例如 McCafferty 等人, *Nature* (自然) 348 :552-554; Clackso 等人, *Nature* (自然) 352 :624-628(1991); Marks 等人, *J. Mol. Biol.* (分子生物学杂志) 222 :581-597(1992); Marks 及 Bradbury, *Methods in Molecular Biology* (分子生物学方法) 248 :161-175(Lo 编, Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu 等人, *J. Mol. Biol.* (分子生物学杂志) 338(2) :

299-310(2004); Lee 等人, *J. Mol. Biol.* (分子生物学杂志) 340(5):1073-1093(2004); Fellouse, *PNAS USA* 101(34):12467-12472(2004) 和 Lee 等人, *J. Immunol. Methods* (免疫学方法杂志) 284(1-2):119-132(2004) 中描述。

[0178] 在某些噬菌体展示方法中, VH 及 VL 基因库 (repertoire) 是通过聚合酶链式反应 (PCR) 分别克隆并且随机重组于噬菌体文库中, 随后可如 Winter 等人, *Ann. Rev. Immunol.* (免疫学年度综述), 12:433-455(1994) 中所述在其中筛选抗原结合噬菌体。噬菌体通常呈现单链 Fv (scFv) 片段或 Fab 片段形式的抗体片段。来自免疫来源的文库无需构建杂交瘤即可提供免疫原的高亲和力抗体。或者, 天然库可经克隆 (例如自人类) 以在无任何免疫的情况下提供针对多种非自体抗原以及自体抗原的抗体单一来源, 如 Griffiths 等人, *EMBO J*, 12:725-734(1993) 所述。最后, 也可以通过从干细胞克隆未重排的 V 基因区段, 并且使用含有随机序列的 PCR 引物来编码高变性 CDR3 区, 并且实现体外重排来合成制得天然文库, 如 Hoogenboom 及 Winter, *J. Mol. Biol.* (分子生物学杂志), 227:381-388(1992) 所述。描述人类抗体噬菌体文库的专利公开物包括例如: 美国专利第 5,750,373 号, 及美国专利公开第 2005/0079574 号、第 2005/0119455 号、第 2005/0266000 号、第 2007/0117126 号、第 2007/0160598 号、第 2007/0237764 号、第 2007/0292936 号和第 2009/0002360 号。

[0179] 从人类抗体文库分离的抗体或抗体片段被视为本文的人类抗体或人类抗体片段。

[0180] D. 嵌合及人源化抗体

[0181] 在某些实施方案中, 本文中所提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体于例如美国专利第 4,816,567 号; 及 Morrison 等人, *PNAS USA*, 81:6851-6855(1984) 中描述。在一个实例中, 嵌合抗体包含非人类可变区 (例如源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或例如猴的非人类灵长类动物的可变区) 及人类恒定区。在另一实例中, 嵌合抗体是种类或亚类已经自亲本抗体的种类或亚类发生变化的“种类转变”抗体。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0182] 在某些实施方案中, 嵌合抗体是人源化抗体。通常, 非人类抗体经人源化以降低对人类的免疫原性, 同时保持亲本非人类抗体的特异性及亲和力。一般而言, 人源化抗体包含一个或多个可变结构域, 其中 HVRs, 例如 CDRs (或其部分) 源自非人类抗体, 且 FRs (或其部分) 是源自人类抗体序列。人源化抗体视情况也将包含人类恒定区的至少一部分。在一些实施方案中, 人源化抗体中的一些 FR 残基经来自非人类抗体 (例如 HVR 残基所源自的抗体) 的相应残基置换, 例如以恢复或提高抗体特异性或亲和力。

[0183] 人源化抗体及其制备方法于例如 Almagro 和 Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633(2008) 中评述, 且进一步于例如 Riechmann 等人, *Nature* (自然) 332:323-329(1988); Queen 等人, *PNAS USA* 86:10029-10033(1989) 美国专利第 5,821,337 号、第 7,527,791 号、第 6,982,321 号和第 7,087,409 号; Kashmiri 等人, *Methods* (方法) 36:25-34(2005) (描述 SDR(a-CDR) 移植) Padlan, *Mol. Immunol.* (分子免疫学) 28:489-498(1991) (描述“表面重整”); Dall'Acqua 等人, *Methods* 36:43-60(2005) (描述“FR 重组 (shuffling)”) 及 Osboum 等人, *Methods* (方法) 36:61-68(2005) 和 Klimka 等人, *Br. J. Cancer* (英国癌症杂志), 83:252-260(2000) (描述 FR 重组 (shuffling) 的“导向选择”方法) 中描述。

[0184] 可用于人源化的人类构架区包括, 但不限于, 使用“最佳拟合”法选择的构架区 (参见例如 Sims 等人, *J. Immunol.* (免疫学杂志) 151:2296(1993)); 源自特定亚群的轻

链或重链可变区的人类抗体共同序列的构架区（参见例如 Carter 等人, PNAS USA, 89 : 4285(1992) 及 Presta 等人, J. Immunol. (免疫学杂志), 151 :2623(1993)）；人类成熟（体细胞突变）构架区或人类生殖系构架区（参见例如 Almagro 及 Fransson, Front. Biosci. 13 : 1619-1633(2008)）；及源自筛选 FR 文库的构架区（参见例如 Baca 等人, J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 272 :10678-10684(1997) 及 Rosok 等人, J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 271 : 22611-22618(1996)）。

[0185] E. 多特异性抗体

[0186] 在某些实施方案中,本文中所提供的抗体是多特异性抗体,例如双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两个不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中,一种结合特异性是针对 $\alpha 5 \beta 1$ 而另一种是针对任何其他抗原（例如 VEGF）。在某些实施方案中,双特异性抗体可结合至 $\alpha 5 \beta 1$ 的两个不同抗原表位。双特异性抗体也可用于将细胞毒性剂定位于表达 $\alpha 5 \beta 1$ 的细胞。双特异性抗体可制成全长抗体或抗体片段形式。

[0187] 制造多特异性抗体的技术包括,但不限于,具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达（参见 Milstein 及 Cuello, Nature(自然) 305 :537(1983) ; WO 93/08829 ; 及 Traunecker 等人, EMBO J. 10 :3655(1991)）, 及“凸起-入-孔洞(knob-in-hole)”工程改造（参见例如美国专利第 5,731,168 号）。也可通过以下方法制得多特异性抗体:工程改造用于制备抗体 Fc-异二聚体的静电导引作用(WO 2009/089004A1) ;将两种或两种以上抗体或片段交联（参见例如美国专利第 4,676,980 号,及 Brennan 等人 Science(科学), 229 :81(1985)）;使用亮氨酸拉链来产生双特异性抗体（参见例如 Kostelny 等人, J. Immunol. (免疫学杂志), 148(5) :1547-1553(1992)）;使用“双抗体”技术来制得双特异性抗体片段（参见例如 Hollinger 等人, PNAS USA, 90 : 6444-6448(1993)）;及使用单链 Fv(sFv) 二聚体（参见例如 Gruber 等人, J. Immunol. (免疫学杂志), 152 :5368(1994)）及如例如 Tutt 等人, J. Immunol. (免疫学杂志) 147 :60(1991) 中所述制备三特异性抗体。

[0188] 本文中也包括具有三个或三个以上功能性抗原结合位点的经工程改造抗体,包括“章鱼抗体(Octopus antibodies)”（参见例如 US2006/0025576A1）。本文中的抗体或片段也包括包含结合至 $\alpha 5 \beta 1$ 以及另一不同抗原的抗原结合位点的“双重作用 FAb 或“DAF”（例如参见 US2008/0069820）。

[0189] F. 抗体变体

[0190] 在某些实施方案中,涵盖本文中所提供抗体的氨基酸序列变体。举例来说,可能需要其来提高抗体的结合亲和力和/或其他生物特性。可通过在编码抗体的核苷酸序列中引入适当修饰或通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。这些修饰包括例如抗体氨基酸序列内的残基缺失和/或插入其中和/或对其进行置换。可进行缺失、插入和置换的任何组合以获得最终构建体,其限制条件是最终构建体具有所需特征,例如抗原结合。

[0191] 1. 置换、插入和缺失变体

[0192] 在某些实施方案中,提供具有一个或多个氨基酸置换的抗体变体。用于置换性诱变的相关位点包括 HVRs 和 FRs 的保守性置换列于表 1 中的“保守性置换”的标题下。更多实质性变化于表 1 中的“示例性置换”的标题下提供且如下文关于氨基酸侧链种类进一步描述。可将氨基酸置换引入相关抗体中并筛选具有所需活性,例如保持/提高的抗原结合、

降低的免疫原性、或提高的 ADCC 或 CDC 的产物。

[0193] 表 1

[0194]

原始残基	示例性置换	优选的置换
Ala(A)	Val ;Leu ;Ile	Val
Arg(R)	Lys ;Gln ;Asn	Lys
Asn(N)	Gln ;His ;Asp, Lys ;Arg	Gln
Asp(D)	Glu ;Asn	Glu
Cys(C)	Ser ;Ala	Ser
Gln(Q)	Asn ;Glu	Asn
Glu(E)	Asp ;Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn ;Gln ;Lys ;Arg	Arg
Ile(I)	Leu ;Val ;Met ;Ala ;Phe ;正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸 ;Ile ;Val ;Met ;Ala ;Phe	Ile
Lys(K)	Arg ;Gln ;Asn	Arg
Met(M)	Leu ;Phe ;Ile	Leu
Phe(F)	Trp ;Leu ;Val ;Ile ;Ala ;Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val ;Ser	Ser
Trp(W)	Tyr ;Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp ;Phe ;Thr ;Ser	Phe
Val(V)	Ile ;Leu ;Met ;Phe ;Ala ;正亮氨酸	Leu

[0195] 可根据常见侧链特性将氨基酸分组：

[0196] (1) 疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0197] (2) 中性亲水性 Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0198] (3) 酸性 Asp、Glu；

[0199] (4) 碱性 His、Lys、Arg；

[0200] (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro

[0201] (6) 芳香性 Trp、Tyr、Phe。

[0202] 非保守性置换将需要将一种这些种类中的成员换成另一种类。

[0203] 一种类型的置换变体涉及置换亲本抗体（例如人源化抗体或人类抗体）的一个或多个高变区残基。一般而言，选择用于进一步研究的所得变体的某些生物学特性相对于亲本抗体改变（例如提高）（例如亲和力增加、免疫原性降低）和 / 或将实质上保持亲本抗体的某些生物学特性。示例性置换变体是亲和力成熟抗体，其可例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术，例如本文中所述的那些，方便地产生。简言之，一个或多个 HVR 残基被突变，且变异抗体呈现于噬菌体上，并针对特定生物活性（例如结合亲和力）对其进行筛选。

[0204] 可在 HVR 中进行改变（例如置换），例如以提高抗体亲和力。这些改变可于 HVR “热点”也即由在体细胞成熟过程中经历高频率突变的密码子编码的残基中进行（参见例如 Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* (分子生物学方法) 207 :179-196 (2008))；和 / 或于 SDRs (a-CDRs)，其中测试所得变异 VH 或 VL 的结合亲和力。通过构建并且自第二文库重新选择而获得的亲和力成熟已于例如 Hoogenboom 等人, *Methods in Molecular Biology* (分子生物学方法) 178 :1-37 (O'Brien 等人编 Human Press, Totowa, NJ, (2001).) 中描述。在亲和力成熟的一些实施方案中，通过多种方法（例如易错 PCR (error-prone PCR)、链重组 (shuffling) 或寡核苷酸定向诱变) 中任一种将多样性引入经选择以供成熟的可变基因中。随后产生第二文库。随后筛选该文库以鉴别具有所需亲和力的任何抗体变体。另一引入多样性的方法涉及 HVR 定向方法，其中随机选择若干个 HVR 残基（例如每次 4-6 个残基）。可例如使用丙氨酸扫描诱变或模型化特定地鉴别抗原结合中所涉及的 HVR 残基。特定地，通常靶向 CDR-H3 及 CDR-L3。

[0205] 在某些实施方案中，置换、插入或缺失可在一个或多个 HVR 内进行，只要这些改变不实质上降低抗体结合抗原的能力即可。举例来说，可在 HVR 中进行不实质上降低结合亲和力的保守性改变（例如如本文中提供的保守性置换）。这些改变可在 HVR “热点”或 SDR 外部。在上文提供的变异 VH 及 VL 序列的某些实施方案中，各 HVR 未经改变，或含有不超过一个、两个或三个氨基酸置换。

[0206] 适用于鉴别可靶向以供诱变的抗体的残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描诱变”如 Cunningham 及 Wells (1989) *Science* (科学), 244 :1081-1085 所述。在此方法中，残基或靶残基的群（例如诸如 arg、asp、his、lys 及 glu 的带电残基）经鉴别且由中性或带负电氨基酸（例如丙氨酸或聚丙氨酸）置换以确定是否影响抗体与抗原的相互作用。可在对初始置换显示功能敏感性的氨基酸位置处引入其他置换。或者或另外，抗原-抗体复合物的晶体结构用于鉴别抗体与抗原之间的接触点。这些接触残基及邻近残基可以作为置换候选物被靶向或消除。可以筛选变体以确定其是否含有所需特性。

[0207] 氨基酸序列插入物包括长度在一个残基至含有一百个或一百个以上残基的多肽范围内的氨基端和 / 或羧基端融合体，以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入物。末端插入物的实例包括具有 N 端甲硫胺酰基残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的

N 端或 C 端与酶（例如对于 ADEPT 而言）或增加抗体的血清半衰期的多肽的融合体。

[0208] 2. 糖基化变体

[0209] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体经改变以增加或降低抗体经糖基化的程度。对抗体的糖基化位点的添加或缺失可通过改变氨基酸序列以便产生或移除一或多个糖基化位点而方便地实现。

[0210] 若抗体包含 Fc 区,则与其连接的糖类可以被改变。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含一般通过 N- 连接与 Fc 区 CH2 结构域的 Asn297 连接的分支链双触角寡糖。参见例如 Wright 等人, TIBTECH 15 :26-32(1997)。寡糖可包括多种糖类,例如甘露糖、N- 乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc)、半乳糖及唾液酸,以及与双触角寡糖结构的“主干”中的 GlcNAc 连接的岩藻糖。在一些实施方案中,可对本发明抗体中的寡糖进行修饰以产生具有某些改良特性的抗体变体。

[0211] 在一实施方案中,提供具有缺乏与 Fc 区连接（直接或间接）的岩藻糖的糖结构的抗体变体。举例来说,该抗体中岩藻糖的量可以是 1% 至 80%、1% 至 65%、5% 至 65% 或 20% 至 40%。通过相对于根据 MALDI-TOF 质谱法所测量的所有与 Asn 297 连接的糖结构（例如复合型、杂合型及高甘露糖型结构）的总和,计算糖链内 Asn297 处岩藻糖的平均量来测定岩藻糖的量,例如如 WO 2008/077546 中所述。Asn297 是指位于 Fc 区中约位置 297 处 (Fc 区残基的 Eu 编号) 的天冬酰胺残基;然而,由于抗体中的微小序列变化,Asn297 也可能位于位置 297 上游或下游约 ± 3 个氨基酸处,也即介于位置 294 与 300 之间。这些岩藻糖基化变体可具有提高的 ADCC 功能。参见例如美国专利公开第 US 2003/0157108 号 (Presta, L.) ;第 US2004/0093621 号 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。与“去岩藻糖基”或“岩藻糖缺乏”抗体变体有关的公开文本的实例包括 US 2003/0157108 ;WO2000/61739 ;WO 2001/29246 ;US 2003/0115614 ;US 2002/0164328 ;US2004/0093621 ;US 2004/0132140 ;US 2004/0110704 ;US 2004/0110282 ;US 2004/0109865 ;WO 2003/085119 ;WO 2003/084570 ;WO 2005/035586 ;WO 2005/035778 ;WO 2005/053742 ;WO 2002/031140 ;Okazaki 等人, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 336 :1239-1249(2004) ;Yamane-Ohnuki 等人, Biotech. Bioeng. (生物技术和生物工程) 87 :614(2004)。能够产生脱除岩藻糖基的抗体的细胞系的实例包括蛋白质岩藻糖基化缺乏的 Lec13CHO 细胞 (Ripka 等人 Arch. Biochem. Biophys. 249 :533-545(1986) ;美国专利申请案第 US 2003/0157108A1 号, Presta, L 及 WO 2004/056312A1, Adams 等人, 尤其实例 11) ;及基因敲除细胞系,例如 α -1,6- 岩藻糖基转移酶基因、FUT8、基因敲除 CHO 细胞 (参见例如 Yamane-Ohnuki 等人, Biotech. Bioeng. (生物技术和生物工程) 87 :614(2004) ;Kanda, Y. 等人, Biotechnol. Bioeng. (生物技术和生物工程), 94(4) :680-688(2006) ;及 WO2003/085107)。

[0212] 进一步提供具有平分型寡糖 (bisected oligosaccharide) 的抗体变体,例如其中与抗体的 Fc 区连接的双触角寡糖经 GlcNAc 平分。这些抗体变体可具有降低的岩藻糖基化和 / 或提高的 ADCC 功能。这些抗体变体的实例例如于 WO 2003/011878 (Jean-Mairret 等人) ;美国专利第 6,602,684 号 (Umana 等人) ;及 US 2005/0123546 (Umana 等人) 中描述。也提供在与 Fc 区连接的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。这些抗体变体可具有提高的 CDC 功能。这些抗体变体于例如 WO 1997/30087 (Patel 等人) ;WO 1998/58964 (Raju, S.) ;及 WO 1999/22764 (Raju, S.) 中描述。

[0213] 3. Fc 区变体

[0214] 在某些实施方案中,可在本文中所提供抗体的 Fc 区中引入一个或多个氨基酸修饰,以此产生 Fc 区变体,以便增强例如抗体治疗涉及异常血管发生和 / 或血管通透性或渗漏的疾病或病症的有效性。Fc 区变体可包含在一或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如置换)的人类 Fc 区序列(例如人类 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4Fc 区)。

[0215] 在某些实施方案中,本发明涵盖具有一些但非所有效应子功能的抗体变体,这使其成为某些应用的理想候选物,在所述应用中抗体的活体内半衰期是重要的,但某些效应子功能(例如补体及 ADCC)是不必要或有害的。可进行体外和 / 或体内细胞毒性测定以确认 CDC 和 / 或 ADCC 活性的降低 / 衰竭。举例来说,可进行 Fc 受体 (FcR) 结合测定以确保抗体缺乏 Fc γ R 结合(因此可能缺乏 ADCC 活性),但保持 FcRn 结合能力。介导 ADCC 的初级细胞、NK 细胞仅表达 Fc γ RIII,而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 及 Fc γ RIII。FcR 在造血细胞上的表达于 Ravetch 及 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* (免疫学年度综述) 9 : 457-492(1991) 的第 464 页上的表 3 中总结。评定相关分子的 ADCC 活性的体外测定的非限制性实例于美国专利第 5,500,362 号(参见例如 Hellstrom, I. 等人, *PNAS USA* 83 : 7059-7063(1986)) 及 Hellstrom, I 等人, *PNAS USA* 82 :1499-1502(1985); 第 5,821,337 号(参见 Bruggemann, M. 等人, *J. Exp. Med.* (实验医学杂志) 166 :1351-1361(1987)) 中描述。或者,可采用非放射性测定方法(参见例如用于流式细胞术的 ACT1™ 非放射性细胞毒性测定 (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA) 及 CytoTox 96® 非放射性细胞毒性测定 (Promega, Madison, WI))。适用于这些测定的效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 及自然杀伤 (NK) 细胞。或者或另外,相关分子的 ADCC 活性可于体内评定,例如在例如 Clynes 等人, *PNAS USA* 95 :652-656(1998) 中所揭示的动物模型中评定。也可进行 C1q 结合测定以证明抗体无法结合 C1q 且因此缺乏 CDC 活性。参见例如 WO 2006/029879 及 WO 2005/100402 中的 C1q 及 C3c 结合 ELISA。为评定补体活化,可进行 CDC 测定(参见例如 Gazzano-Santoro 等人, *J. Immunol. Methods* (免疫学方法杂志) 202 :163(1996) Cragg, M. S. 等人, *Blood* (血液) 101 :1045-1052(2003) 及 Cragg, M. S. 及 M. J. Glennie, *Blood* 103 :2738-2743(2004))。也可使用本领域中已知的方法进行 FcRn 结合及活体内清除 / 半衰期测定(参见例如 Petkova, S. B. 等人, *Int'l. Immunol.* (国际免疫学) 18(12) :1759-1769(2006))。

[0216] 效应子功能降低的抗体包括 Fc 区残基 238、265、269、270、297、327 及 329 中一个或多个置换的那些抗体(美国专利第 6,737,056 号)。这些 Fc 突变体包括在氨基酸位置 265、269、270、297 和 327 的两个或两个以上位置处具有置换的 Fc 突变体,包括残基 265 和 297 置换为丙氨酸的所谓的“DANA”Fc 突变体(美国专利第 7,332,581)。

[0217] 描述某些与 FcRs 的结合提高或减少的抗体变体。(参见例如美国专利第 6,737,056 号;WO 2004/056312 及 Shields 等人, *J. Biol. Chem.* (生物化学杂志) 9(2) : 6591-6604(2001))。

[0218] 在某些实施方案中,抗体变体包含具有一个或多个提高 ADCC 的氨基酸置换的 Fc 区,例如在 Fc 区的位置 298、333 和 / 或 334(残基的 EU 编号)处置换。

[0219] 在一些实施方案中,在 Fc 区中进行改变,其导致 C1q 结合和 / 或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 改变(也即,通过提高或降低),例如如美国专利第 6,194,551 号、WO 99/51642 和 Idusogie 等人, *J. Immunol.* (免疫学杂志) 164 :4178-4184(2000) 中所述。

[0220] 可在 Fc 区序列中进行突变或改变以提高 FcR 结合 (例如 Fc γ R、FcRn)。根据一实施方案,本发明的抗体具有至少一种选自以下组成的组的与天然 IgG 或亲本抗体相比,改变的效应子功能 ADCC、CDC 及提高 FcRn 结合。若干种通用的特定突变的实例于例如 Shields, RL 等人, (2001) JBC 276(6)6591-6604 ;Presta, L. G., (2002) Biochemical Society Transactions (生物化学协会学报) 30(4) :487-490 及 WO 00/42072 中描述。US2005/0014934A1 (Hinto 等人) 中描述具有增加的半衰期及提高的与新生儿 Fc 受体 (FcRn) 的结合的抗体,其中 FcRn 负责将母体 IgG 转移至胎儿 (Guyer 等人 J. Immunol. (免疫学杂志) 117 :587(1976) 及 Kim 等人, J. Immunol. (免疫学杂志) 24 :249(1994))。那些抗体包含具有一或多个置换的 Fc 区,所述置换提高 Fc 区与 FcRn 的结合。这些 Fc 变体包括在 Fc 区残基 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424 或 434 中的一或多者处具有置换 (例如置换 Fc 区残基 434) 的那些 Fc 变体 (美国专利第 7, 371, 826 号)。

[0221] 关于 Fc 区变体的其他实例,也参见 Duncan 及 Winter, Nature (自然) 322 :738-40(1988) ;美国专利第 5, 648, 260 号 ;美国专利第 5, 624, 821 号 ;及 WO 94/29351。

[0222] 4. 经半胱氨酸工程改造的抗体变体

[0223] 在某些实施方案中,可能需要产生经半胱氨酸工程改造的抗体,例如“硫代 MAb”,其中抗体的一或多个残基经半胱氨酸残基置换。在特定实施方案中,经置换的残基出现在抗体的可接近位点处。通过用半胱氨酸置换那些残基,反应性硫醇基团通过定位于抗体的可接近位点处且可用于将抗体结合至其他部分,例如药物部分或接头-药物部分,以产生如本文中进一步描述的免疫缀合物。在某些实施方案中,任一或多个以下残基可经半胱氨酸置换:轻链的 V205 (Kabat 编号);重链的 A118 (EU 编号);及重链 Fc 区的 S400 (EU 编号)。可如例如美国专利第 7, 521, 541 号中所述产生经半胱氨酸工程改造的抗体。

[0224] 在一些实施方案中,可在 Fc 区中引入半胱氨酸残基,借此在此区域中形成链间二硫键。因此产生的均二聚抗体可具有提高的内化能力和/或增加的补体介导性细胞杀死,及抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。参见 Caron 等人, J. Exp. Med. (实验医学杂志), 176 :1191-1195(1992) 及 Shopes, J. Immunol. (免疫学杂志), 148 :2918-2922(1992)。也可使用异双功能交联剂制备具有增强的抗肿瘤活性的均二聚抗体,如 Wolff 等人, Cancer Research (癌症研究), 53 :2560-2565(1993) 中所述。或者,抗体可经工程改造为具有双 Fc 区且借此可具有增强的补体溶解及 ADCC 能力。参见 Stevenson 等人, Anti-Cancer Drug Design (抗癌药物设计), 3 :219-230(1989)。

[0225] 5. 抗体衍生物

[0226] 在某些实施方案中,本文中所提供的抗体可进一步经修饰为含有本领域中已知且轻易获得的其他非蛋白质部分。适合抗体衍生作用的部分包括,但不限于,水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括,但不限于,聚乙二醇 (PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二噁烷、聚-1,3,6-三噁烷三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)、及葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇、及其混合物。聚乙二醇丙醇因其在水中的稳定性可能具有制造优势。聚合物可具有任何分子量,且可有分支或无分支。与抗体连接的聚合物的数目可以变化,且

若连接一种以上聚合物,则其可以是相同或不同分子。一般而言,用于衍生作用的聚合物数目和/或类型可以基于包括,但不限于,以下的考虑因素来确定:欲提高抗体的特定特性或功能、抗体衍生物是否将用于指定条件下的疗法等。

[0227] 在另一实施方案中,提供抗体与可通过暴露于辐射来选择性加热的非蛋白质部分的缀合物。在一个实施方案中,非蛋白质部分是碳纳米管(Kam等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA(美国科学院学报)102:11600-11605(2005))。该辐射可具有任何波长,且包括但不限于,不损伤普通细胞但能将非蛋白质部分加热至可杀死抗体-非蛋白质部分附近的细胞的温度的波长。

[0228] G. 免疫缀合物

[0229] 本发明也提供包含本文中的抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体与一或多种细胞毒性剂,例如化疗剂或药物、生长抑制剂、毒素(例如蛋白质毒素、细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素,或其片段)或放射性同位素结合的免疫缀合物。

[0230] 在一实施方案中,免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中抗体与一种或多种药物结合,所述药物包括,但不限于,美坦生类化合物(参见美国专利第5,208,020号、第5,416,064号及欧洲专利EP 0 425 235 B1);奥利司他汀(auristatin),例如单甲基奥利司他汀药物(monomethylauristatin)部分DE及DF(MMAE及MMAF)(参见美国专利第5,635,483号及第5,780,588号,及第7,498,298号);多拉司他汀(dolastatin);加利车霉素(calicheamicin)或其衍生物(参见美国专利第5,712,374号、第5,714,586号、第5,739,116号、第5,767,285号、第5,770,701号、第5,770,710号、第5,773,001号及第5,877,296号Hinman等人,Cancer Res.(癌症研究)53:3336-3342(1993);及Lode等人,Cancer Res.(癌症研究)58:2925-2928(1998));蒽环类抗生素(anthracycline),例如道诺霉素(daunomycin)或多柔比星(参见Kratz等人Current Med. Chem. 13:477-523(2006);Jeffrey等人,Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362(2006);Torgov等人,Bioconj. Chem. 16:717-721(2005);Nagy等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA(美国科学院学报)97:829-834(2000);Dubowchik等人,Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532(2002);King等人,J. Med. Chem. 45:4336-4343(2002);及美国专利第6,630,579号);甲氨喋呤(methotrexate);长春地辛(vindesine);紫杉烷(taxane),例如多西他赛(docetaxel)、紫杉醇(paclitaxel)、拉洛紫杉醇(larotaxel)、特赛紫杉醇(tesetaxel)及奥他紫杉醇(ortataxel);单端孢霉烯族化合物(trichothecene);及CC1065。

[0231] 在另一实施方案中,免疫缀合物包含如本文中所述的抗体与酶促活性毒素或其片段结合,酶促活性毒素或其片段包括,但不限于,白喉(diphtheria)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*)蛋白、香石竹毒蛋白(dianthin protein)、美洲商陆(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-s)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(crotin)、肥皂草(*sapaonaria officinalis*)抑制剂、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)和单端孢霉烯族化合物(trichothecenes)。

[0232] 在另一实施方案中,免疫缀合物包含如本文中所述的抗体与放射性原子结合形成

放射性缀合物。多种放射性同位素可用于制备放射性缀合物。实例包括 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹² 及 Lu 的放射性同位素。当使用放射性缀合物进行检测时，其可包含用于闪烁摄影研究的放射性原子，例如 tc99m 或 I123 或用于核磁共振 (NMR) 成像（也称为磁共振成像，mri）的自旋标记物，例如碘 -123 及碘 -131、钆 -111、氟 -19、碳 -13、氮 -15、氧 -17、钆、锰或铁。

[0233] 抗体与细胞毒性剂的缀合物可使用多种双功能蛋白质偶合剂制得，例如 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯 (SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯 (SMCC)、亚氨基硫烷 (IT)、亚氨酸酯（诸如盐酸二甲基己二亚酰胺化物）、活性酯类（诸如辛二酸二琥珀酰亚胺基酯）、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）己二胺）、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。举例来说，蓖麻毒蛋白免疫毒素可如 Vitetta 等人，Science (科学) 238 : 1098 (1987) 中所述来制备。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) 是用于使放射性核苷酸与抗体结合的示例性螯合剂。参见 WO 94/11026。接头可以是促进细胞毒性药物在细胞中释放的“可裂解接头”。举例来说，可使用酸不稳定接头、肽酶敏感性接头、光不稳定接头、二甲基接头或含二硫化物的接头 (Chari 等人，Cancer Res. (癌症研究) 52 : 127-131 (1992) ; 美国专利第 5,208,020 号)。

[0234] 本文中的免疫缀合物或 ADCs 明确涵盖，但不限于，用交联剂试剂制备的这些缀合物，该等交联剂试剂包括，但不限于：BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、硫代-EMCS、硫代-GMBS、硫代-KMUS、硫代-MBS、硫代-SIAB、硫代-SMCC 及硫代-SMPB 及 SVSB (琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基砜)苯甲酸酯)，交联剂试剂可商购获得（例如购自 Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U. S. A.）。

[0235] H. 免疫脂质体

[0236] 本文中所揭示的抗体也可经配制成免疫脂质体。含有所述抗体的脂质体通过本领域中已知的方法来制备，例如 Epstein 等人，PNAS USA, 82 : 3688 (1985) ; Hwang 等人，PNAS USA, 77 : 4030 (1980) ; 及美国专利第 4,485,045 号及第 4,544,545 号中所述。具有增加的循环时间的脂质体于美国专利第 5,013,556 号中揭示。

[0237] 尤其适用的脂质体可通过逆相蒸发方法由包含磷脂酰胆碱、胆固醇及 PEG 衍生的磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的脂质组合物产生。脂质体经由具有界定孔径的过滤器挤出产生具有所需直径的脂质体。本发明抗体的 Fab' 片段可经由二硫化物互换反应与如 Martin 等人，J. Biol. Chem. (生物化学杂志), 257 : 286-288 (1982) 中所述的脂质体结合。抗肿瘤剂、生长抑制剂或化疗剂（例如多柔比星）视情况也含于脂质体内。参见 Gabizon 等人，J. National Cancer Inst. (国家癌症研究杂志), 81 (19) : 1484 (1989)。

[0238] IV. 使用抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的治疗方法

[0239] 任何本文中所提供的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体均可用于治疗方法中。应明了本文中所述的任何制剂或治疗方法可使用本发明的免疫缀合物来替代抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体，或除抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体之外也使用本发明的免疫缀合物。

[0240] 在一方面中，提供用作药物的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体。在进一步的方面中，提供用于治疗涉及异常血管发生和 / 或血管通透性或渗漏的疾病及病症，包括例如癌症、眼疾病及免疫

病症（例如自身免疫病）的抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体。在某些实施方案中，提供用于治疗方法中的抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体。在某些实施方案中，本发明提供用于治疗患有涉及异常血管发生和 / 或血管通透性或渗漏的疾病或病症的个体的方法中的抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体，该方法包括向该个体施用有效量的抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体。在一个这样的实施方案中，方法进一步包含向个体施用有效量的至少一种、两种、三种、四种或更多额外治疗剂，包括例如如本文中所述的抗血管发生剂、抗肿瘤剂、生长抑制剂或化疗剂。在其他实施方案中，本发明提供用于抑制异常血管发生和 / 或血管通透性或渗漏的抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体。在某些实施方案中，本发明提供用于抑制个体异常血管发生和 / 或血管通透性或渗漏的方法中的抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体，所述方法包括向该个体施用有效的抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体来抑制异常血管发生和 / 或血管通透性或渗漏。根据任何上述实施方案的“个体”优选为人类。

[0241] 在另一方面中，本发明提供抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体用于制造或制备药物的用途。在一实施方案中，药物用于治疗涉及异常血管发生和 / 或血管通透性或渗漏的疾病或病症。在另一实施方案中，药物用于治疗涉及异常血管发生和 / 或血管通透性或渗漏的疾病或病症的方法中，该方法包括向患有涉及异常血管发生和 / 或血管通透性或渗漏的疾病或病症的个体施用有效量的药物。在一个这样的实施方案中，方法进一步包含向个体施用有效量的至少一种、两种、三种、四种或更多额外治疗剂，包括例如如本文中所述的抗血管发生剂、抗肿瘤剂、生长抑制剂或化疗剂。在另一实施方案中，药物是用于抑制异常血管发生和 / 或血管通透性或渗漏。在另一实施方案中，药物用于抑制个体异常血管发生和 / 或血管通透性或渗漏的方法中，所述方法包括向个体施用有效量的药物以抑制异常血管发生和 / 或血管通透性或渗漏。根据任何上述实施方案的“个体”可以是人类。

[0242] 在另一方面中，本发明提供治疗涉及异常血管发生和 / 或血管通透性或渗漏的疾病或病症的方法。在一实施方案中，方法包括向患有涉及异常血管发生和 / 或血管通透性或渗漏的疾病或病症的个体施用有效量的抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体。在一个这样的实施方案中，方法进一步包含向个体施用有效量的至少一种如下所述的额外治疗剂。根据任何上述实施方案的“个体”可以是人类。

[0243] 在另一方面中，本发明提供抑制个体异常血管发生和 / 或血管通透性或渗漏的方法。在一个实施方案中，方法包括向个体施用有效量的抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体以抑制异常血管发生和 / 或血管通透性或渗漏。在一实施方案中，“个体”是人类。

[0244] 在另一方面中，本发明提供例如用于任何上述治疗方法中的包含任何本文中所提供的抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体的药物制剂。在一实施方案中，药物制剂包含任何本文中所提供的抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体及药学上可接受的载体。在另一实施方案中，药物制剂包含任何本文中所提供的抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体及至少一种例如本文中所述的额外治疗剂。

[0245] 本文中所述的组合疗法涵盖组合施用（其中两种、三种、四种或更多治疗剂包括于同一或分别的制剂中）及分别施用，在分别施用的情况下，可在施用额外治疗剂和 / 或佐剂的前、同时和 / 或的后施用本发明的抗体。本发明的抗体也可与放射疗法组合使用。

[0246] 在某些实施方案中，额外治疗剂是 VEGF 拮抗剂（例如抗 VEGF 抗体，例如贝伐珠单抗）。在一些实施方案中，抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体是与 VEGF 拮抗剂组合施用。抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗体及额外药剂（例如 VEGF 拮抗剂）可同时或依序施用。或者，可用 VEGF 拮抗剂治疗受试者且随后施用 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗剂，例如用 VEGF 拮抗剂治疗直至受试者对 VEGF 拮抗剂治疗无反应且

随后用 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂治疗受试者。根据一实施方案,当癌症是非侵袭性时用 VEGF 拮抗剂治疗受试者,且随后当癌症是侵袭性时用 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂治疗受试者。相较未患病患者或对照者,经历 $\alpha 5 \beta 1$ 水平自然升高或响应 VEGF 拮抗剂疗法而升高的一些患者可尤其对该组合治疗有反应。涵盖进一步包含治疗剂(例如抗肿瘤剂、化疗剂、生长抑制剂及细胞毒性剂)的组合。举例来说,欲用化学疗法(例如伊立替康)及 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂治疗或已用化学疗法及 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂治疗的患者可受益于 VEGF 拮抗剂疗法。或者,已用化学疗法及 VEGF 拮抗剂治疗的患者可受益于 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂疗法。在一实施方案中,抗-VEGF 抗体是贝伐珠单抗。在另一实施方案中,抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体是本文中所述的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体。

[0247] 本发明的抗体(及任何额外治疗剂)可通过任何适合方式(包括肠胃外、肺内及鼻内)施用,且若需要局部治疗,则是病灶内施用。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。在一定程度上根据用药是短期或长期性而定,可通过任何适合途径,例如通过注射,例如静脉内或皮下注射给药。本文中涵盖各种给药时程,包括,但不限于,单次施用或在多个时间点多次施用、推注施用及脉冲输注。

[0248] 本发明的抗体将以符合良好的医学实践的方式配制、给药及施用。在此上下文中考虑的因素包括所治疗的特定病症、所治疗的特定哺乳动物、个别患者的临床病状、病症的起因、药剂的传递部位、用药方法、用药时程及医学专业人员已知的其他因素。抗体无需但可视情况与一或多种当前用于预防或治疗所述病症的药剂一起配制。这些其他药剂的有效量视制剂中存在的抗体量、病症或治疗的类型及上文所讨论的其他因素而定。这些药剂一般以与本文中所述相同的剂量及用药途径使用,或以本文中所述剂量的约 1% 至 99% 使用,或以根据经验/临床上确定为适当的任何剂量且任何途径使用。

[0249] 为预防或治疗疾病,本发明抗体(当单独使用或与一或多种其他额外治疗剂组合使用时)的适当剂量将视以下因素而定:欲治疗疾病的类型、抗体类型、疾病的严重度及疾病进展、抗体是否是预防性或治疗性目的而施用、先前的疗法、患者的临床病史及对抗体的反应和主治医师的判断。抗体适合一次性或经一系列治疗施用至患者。视疾病的类型及严重度而定,无论例如通过一或多次各别施用,或通过连续输注,向患者施用抗体的初始候选剂量可以是约 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $15\text{mg}/\text{kg}$ (例如 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ - $10\text{mg}/\text{kg}$)。视上文所提及的因素而定,一种典型每日剂量可在约 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 或更多的范围内。对于历经数天或更长时间重复施用,治疗视病状而定一般将持续至疾病症状出现所需要的抑制。抗体的一种示例性剂量在约 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ 至约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 范围内。因此,可向患者施用药约 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 或 $10\text{mg}/\text{kg}$ (或其任何组合)的一种或多种剂量。这些剂量可间歇地施用,例如每周一次或每三周一次(例如以使得患者接受约 2 至约 20、或例如约 6 个剂量的抗体)。最初可施用较高负荷剂量,接着可施用一或多个较低剂量。然而,其他给药方案可能适用。该疗法的进程易于统计常规技术及方法监测。

[0250] 视欲治疗适应症及熟悉本领域的医师所熟知的给药相关因素而定,本发明抗体将以可有效治疗适应症,同时使毒性及副作用降至最低的剂量施用。

[0251] 可通过例如,但不限于,肿瘤消退、肿瘤重量或尺寸缩减、进展的时间、存活持续时间、无进展存活、总反应速率、反应持续时间、生活质量、蛋白质表现和/或活性来评估癌症治疗。因为本文中所述的抗血管发生剂靶向肿瘤血管结构而不一定靶向新生性细胞本身,所以其代表一种独特种类的抗癌药,且因此可能需要对药物临床反应进行独特测定和定

义。举例来说,在二维分析中 50% 以上的肿瘤缩减是表明反应的标准截止值。然而,本发明的 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂及 VEGF 拮抗剂可抑制转移性扩散而不使原发肿瘤缩减,或可简单地发挥肿瘤抑制作用。因此,可采用测定疗法功效的方法,包括例如测量血管发生的血浆或尿标志和通过放射成像测量反应。

[0252] 对于年龄相关的黄斑部变性 (AMD) 的治疗的评估包括,但不限于,视力进一步损失速率的降低或防止视力进一步损失。关于 AMD 疗法,可例如通过一或多种以下方法测量活体内功效:评定至所需时间时,最佳矫正视觉敏锐度 (best corrected visual acuity, BCVA) 与基线相比的平均变化;评定在所需时间时与基线相比视觉敏锐度失去少于 15 个字母的受试者的比例;评定在所需时间时,与基线相比视觉敏锐度获得大于或等于 15 个字母的受试者的比例;评定在所需时间时具有 Snellen 等效值为 20/2000 或更差的视觉敏锐度的受试者的比例;评定 NEI 视觉功能问卷 (Visual Functioning Questionnaire) 评定在所需时间时 CNV 的尺寸及 CNV 的渗漏量,如由荧光素血管摄影术及其类似方法评定。

[0253] V. 药物制剂

[0254] 抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体可与适合载体或赋形剂一起配制以使其适于施用。通过将具有所需纯度的抗体与视情况选用的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A. 编 (1980)) 混合而获得呈冻干制剂或水溶液形式的适合抗体制剂。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用剂量及浓度下对接受者无毒,且包括:缓冲液,例如磷酸盐、柠檬酸盐及其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸及甲硫氨酸;防腐剂(例如氯化十八烷基二甲基苄铵、氯化六羟季铵、氯苄烷铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;及间甲酚);低分子量(少于约 10 个残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯啉酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他糖类,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如 EDTA;糖类,例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐平衡离子,例如钠离子;金属复合体(例如 Zn-蛋白质复合体);和/或非离子表面活性剂,例如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG)。示例性抗体制剂描述于 WO 98/56418 中,其以引用的方式明确并入本文中。本文中的示例性药学上可接受的载体进一步包括药物间质分散剂,例如可溶性中性-活性透明质酸酶糖蛋白 (sHASEGP),例如人类可溶性 PH-20 透明质酸酶糖蛋白,例如 rHuPH20 (HYLENEX® Baxter International, Inc.)。某些示例性 sHASEGPs 及使用方法,包括 rHuPH20,描述于美国专利公开第 2005/0260186 号及第 2006/0104968 号中。在一方面中,sHASEGP 与一中或多种其他葡糖胺聚糖酶例如软骨素酶组合。适于皮下施用的冻干制剂描述于 WO 97/04801 中。这些冻干制剂可以通过合适的稀释剂复原至高蛋白质浓度,且该复原制剂可通过皮下施用至本文中欲治疗的哺乳动物。

[0255] 本文中的制剂也可根据所治疗的特定适应症的需要含有一种以上活性化合物,优选那些具有不会彼此不利地影响的补充活性的化合物。举例来说,可能需要进一步提供抗肿瘤剂、生长抑制剂、细胞毒性剂和/或化疗剂。这些分子适当地以有效达成预期目的的量以组合形式存在。这些其他药剂的有效量视制剂中存在的抗体量、疾病或病症或治疗的类型及上文所讨论的其他因素而定。其一般以与本文中所述相同的剂量及用药途径使用或以迄今所用剂量的约 1% 至 99% 使用。

[0256] 也可将活性成分截留于例如通过凝聚技术或通过界面聚合所制备的微囊,例如,分别是羟甲基纤维素或明胶微囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊中、胶状药物传递系统(例如脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米粒子及纳米囊)中或粗滴乳状液中。这些技术披露于 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A. 编 (1980) 中。

[0257] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有拮抗剂的固体疏水性聚合物的半渗透基质, 基质呈成形物品, 例如薄膜或微囊形式。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利第 3, 773, 919 号)、L-谷氨酸与乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物, 例如 LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物与乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)组成的可注射微球体)、和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0258] 可使用微脂体(Lipofectin)或脂质体将本发明的多肽及抗体或组合物传递至细胞中。若使用抗体片段, 则优选特异性结合至靶蛋白的结合结构域的最小抑制片段。举例来说, 基于抗体的可变区序列, 可设计保持结合靶蛋白序列能力的肽分子。这些肽可化学合成和/或通过重组 DNA 技术产生。参见例如 Marasco 等人, PNAS USA, 90:7889-7893(1993)。

[0259] 也可将活性成分截留于例如通过凝聚技术或通过界面聚合所制备的微囊, 例如分别是羟甲基纤维素或明胶微囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊中、胶状药物传递系统(例如脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米粒子及纳米囊剂)中或粗滴乳状液中。这些技术披露于 Remington's PHARMACEUTICAL SCIENCES, 同上中。

[0260] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有拮抗剂的固体疏水性聚合物的半渗透基质, 基质呈成形物品, 例如薄膜或微囊形式。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利第 3, 773, 919 号)、L-谷氨酸与 γ 乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物, 例如 LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物与乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)组成的可注射微球体)、和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。尽管例如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸的聚合物使分子能够释放 100 天以上, 但某些水凝胶释放蛋白质持续较短时间。当囊包裹的抗体长时间保留于体内时, 其可能由于在 37°C 下暴露于水分中而变性或聚集, 从而导致生物活性损失以及可能的免疫原性变化。根据所涉及的机制, 可设计合理策略以实现稳定化。举例来说, 若发现聚集机制是通过巯基-二硫化物互换形成分子间 S-S 键, 则可通过修饰巯基残基、从酸性溶液中冻干、控制含水量、使用适当添加剂以及开发特定聚合物基质组合物来实现稳定化。

[0261] 欲用于体内施用的制剂必须是无菌的。这可以通过借助无菌过滤、膜过滤而轻易地实现。

[0262] VI. 使用抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的诊断及成像方法

[0263] 特异性结合至 $\alpha 5 \beta 1$ 多肽的经标记抗- $\alpha 5 \beta 1$ 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 $\alpha 5 \beta 1$ 的表达、异常表达和/或活性相关的疾病和/或病症。举例来说, 本发明的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体可用于原位、体内、先体外后体内及体外诊断测定或成像测定中。

[0264] 检测 $\alpha 5 \beta 1$ 多肽的表达的方法包括 (a) 使用一种或多种本发明的抗体测定受试者的细胞(例如组织)或体液中的多肽表达, 及 (b) 比较基因表达量与标准基因表达量, 其

中用经测定基因表达量与标准表达量相比的增加或降低指示异常表达。

[0265] 本发明的其他实施方案包括诊断动物,例如诸如人类的哺乳动物的与 $\alpha 5 \beta 1$ 表达或异常表达相关的疾病或病症的方法。所述方法包括检测哺乳动物体内的 $\alpha 5 \beta 1$ 分子。在一实施方案中,在施用 VEGF 拮抗剂后,诊断包含:(a) 向哺乳动物施用有效量的经标记抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体;(b) 在用药后等待一段时间间隔以允许经标记 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体优先集中于受试者体内表达 $\alpha 5 \beta 1$ 分子的部位(且将未结合的经标记分子清除至本底水平);(c) 测定本底水平;及(d) 检测受试者体内的标记分子,以使得检测到标记分子高于本底水平,指示受试者患有与 $\alpha 5 \beta 1$ 表达或异常表达相关的特定疾病或病症。可通过多种方法测定本底水平,包括比较所检测的标记分子量与先前针对特定系统所测定的标准值。

[0266] 本发明的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体可用于使用本领域技术人员已知的经典免疫组织学方法(例如参见 Jalkanen 等人, *J. Cell. Biol.* (细胞生物学杂志) 101:976-985(1985); Jalkanen 等人, *J. Cell. Biol.* (细胞生物学杂志) 105:3087-3096(1987)) 来测定生物样品中的蛋白质水平。适合检测蛋白质基因表达的其他基于抗体的方法包括免疫测定,例如酶联结免疫吸附测定(ELISA)及放射性免疫测定(RIA)。合适的抗体测定标记物在本领域中已知且包括:酶标记物,例如葡萄糖氧化酶;放射性同位素,例如碘(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟($^{115\text{m}}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、及锝($^{99\text{Tc}}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$)、铪(^{201}Ti)、镓(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、钯(^{103}Pd)、钼(^{99}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(luminol);及荧光标记物,例如荧光素和罗丹明(rhodamine),及生物素。

[0267] 可对本发明的标记抗体应用本领域中已知的技术。这些技术包括,但不限于,使用双功能偶联剂(参见例如美国专利第 5,756,065 号;第 5,714,631 号;第 5,696,239 号;第 5,652,361 号;第 5,505,931 号;第 5,489,425 号;第 5,435,990 号;第 5,428,139 号;第 5,342,604 号;第 5,274,119 号;第 4,994,560 号;及第 5,808,003 号)。

[0268] 根据一特定实施方案,在施用 VEGF 拮抗剂治疗剂之后在诊断或预后测定中通过评估细胞表面上存在的 $\alpha 5 \beta 1$ 的水平(例如通过使用抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的免疫组织化学测定)来测定 $\alpha 5 \beta 1$ 多肽表达或过度表达。或者或另外,可例如通过使用对应于编码 $\alpha 5 \beta 1$ 的核酸或其补体的基于核酸的探针的荧光原位杂交(FISH;参见 1998 年 10 月公开的 W098/45479)、DNA 印迹(Southern blotting)、RNA 印迹(Northern blotting)或聚合酶链式反应(PCR)技术,例如实时定量 PCR(RT-PCR)来测量细胞中编码 $\alpha 5 \beta 1$ 多肽的核酸或 mRNA 的水平。也可例如使用基于抗体的测定通过测量生物流体,例如血清中的流出抗原(shed antigen)来研究 $\alpha 5 \beta 1$ 过度表达(也参见例如 1990 年 6 月 12 日颁发的美国专利第 4,933,294 号;1991 年 4 月 18 日公开的 W091/05264;1995 年 3 月 28 日颁发的美国专利 5,401,638 及 Sias 等人, *J. Immunol. Methods* (免疫学方法杂志) 132:73-80(1990))。除上述测定以外,熟练技术人员也可利用多种体内及离体测定。举例来说,可将哺乳动物体内的细胞暴露于根据情况经可检测标记物,例如放射性同位素标记的抗体,且可例如通过外部扫描放射性或通过分析从先前暴露于抗体的哺乳动物获取的样品(例如活组织检查或其他生物样品)来评估抗体的结合。

[0269] VII. 制品及试剂盒

[0270] 本发明的另一实施方案是含有适用于治疗癌症(例如肿瘤)、眼疾病(例如湿性

AMD) 或自身免疫病及相关病状的物质的制品。所述制品可包含容器及在该容器上或与该容器相联的标签或药品说明书。适合的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可由例如玻璃或塑料的各种材料形成。一般而言,容器容纳可有效治疗病状的组合物且可具有无菌出口孔(例如容器可以是具有可以由皮下注射针刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是本发明的 VEGF 拮抗剂或 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂或 VEGF 激动剂或 $\alpha 5 \beta 1$ 激动剂。卷标或药品说明书指示该组合物是用于治疗特定病状。标签或药品说明书将进一步包含针对向患者施用抗体组合物的说明书。也涵盖包含本文中所述的组合疗法的制品及试剂盒。

[0271] 药品说明书指通常包括于治疗产品的商业包装内的说明书,其含有关于使用这些治疗产品的适应症、用法、剂量、施用、禁忌症和 / 或警告的信息。

[0272] 另外,制品可进一步包含第二容器,包含药学上可接受的缓冲液,例如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液(Ringer' s solution)及葡萄糖溶液。其可进一步包括根据商业及使用者观点所需的其他物质,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针及注射器。

[0273] 也提供根据情况与制品组合适用于各种目的(例如用于分离或检测患者体内的 $\alpha 5 \beta 1$ 和 / 或 VEGF) 的试剂盒。为分离及纯化 $\alpha 5 \beta 1$,试剂盒可以含有抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体与小珠(例如琼脂糖小珠)偶联。可提供含有体外,例如在 ELISA 或蛋白质印迹(Western blot)中检测及定量 $\alpha 5 \beta 1$ 和 / 或 VEGF 的抗体的试剂盒。如同制品一样,试剂盒包含容器及在该容器上或与该容器相联的标签或药品说明书。举例来说,容器容纳包含至少一种本发明的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的组合物。可包括含有例如稀释剂及缓冲液、对照抗体的其他容器。标签或药品说明书可提供关于组合物的描述以及用于所希望的体外或诊断用途的说明书。

[0274] 除非另有说明,否则实施例中所提及的市售试剂根据制造商的说明书使用。在以下实施例及整个说明书中由 ATCC 登录号定义的那些细胞的来源是美国菌种保存中心(American Type Culture Collection), Manassas, VA。除非另有说明,否则本发明使用重组 DNA 技术的标准程序,例如上文及以下教科书中所述的那些 Sambrook 等人,同上;Ausubel 等人, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(当前分子生物学方案)(Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y., 1989);Innis 等人, PCR PROTOCOLS :A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS(PCR 方案:方法和应用指南)(Academic Press, Inc. :N. Y., 1990);Harlow 等人, ANTIBODIES :A LABORATORY MANUAL(抗体:实验室手册)(Cold Spring Harbor Press :Cold Spring Harbor, 1988);Gait, OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS(寡核苷酸合成)(IRL Press :Oxford, 1984);Freshney, ANIMAL CELL CULTURE(动物细胞培养), 1987;Coligan 等人 CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY(当前免疫学方案), 1991。

实施例

[0275] 提供以下实例来说明而非限制所要求保护的发明。本领域技术人员将能够容易地认识到多种非关键参数可经改变或修改以得到基本上相同的结果。

[0276] 实施例 1:材料及方法

[0277] A. BIAcore 分析:

[0278] 为测定本文中所述抗体的结合动力学和亲和力,使用利用 BIAcore™-3000 仪器进行表面等离子共振 (SRP) 检测。先通过不同流槽 (flow cell) 上的预固定兔抗-人 Fc CM5 生物感应芯片捕捉抗体以达到大约 150RU (响应单位)。为进行动力学测量,在 25℃ 下以 30 μ l/min 的流动速率将 2 倍连续稀释的人类整合素 $\alpha 5 \beta 1$ (300nM 至 1.2nM) 注入 PBT 缓冲液 (含有 0.05% Tween 20 的 PBS) 中。使用简单的一对一朗缪耳结合模型 (one-to-one Langmuir binding model) (BIAcore 评估软件 3.2 版) 计算结合速率 (k_{on}) 及解离速率 (k_{off})。以比率 k_{off}/k_{on} 的形式来计算平衡解离常数 (K_D)。

[0279] B. U937 细胞的纤连蛋白结合测定

[0280] 将 100 μ l 以 PBS, pH 7.4, 稀释的 10 μ g/ml 纤连蛋白 (R & D Systems) 添加至 96 孔板 (Nucn MaxiSorp) 的孔中且在 2-8℃ 下孵育过夜。以 200 μ l PBS, pH 7.4, 洗涤板 3 次。向所有孔中添加 200 μ l PBS pH 7.4/1% BSA, 且在室温下在轻微搅动下孵育培养盘至少 60 分钟。以 200 μ l PBS, pH 7.4, 洗涤板 3 次。

[0281] 将 50 μ l 经稀释的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体添加至各孔中 (10 μ g/mL, 以 1 : 3 连续稀释 10 次), 接着立即添加 50 μ l 含浓度为每毫升 1×10^6 个细胞的 U937 细胞 (ATCC, Cat#CRL-1593.2) 的测定培养基 (RPMI 1640 (Media Prep A0806)、5mg/mL BSA、1mM L-谷氨酰胺、1mM $MgCl_2$)。

[0282] 在 37℃ 下孵育板 30 分钟, 丢弃未结合的细胞且以 150 μ l 测定培养基洗涤板两次。向各孔中添加 100 μ l 测定培养基和 100 μ l Cell-Titer Glow (Promega Cat#G7573)。在室温下孵育板 10-15 分钟, 将其覆盖。利用 VICTOR²V (Perkin-Elmer) 板读取器检测发光, 且使用四参数非线性最小平方拟合 (four-parameter nonlinear least squares fit) 分析相对于测定中所用抗体浓度的发光单位, 以获得 IC_{50} 值。

[0283] C. $\alpha 5 \beta 1$ 的纤连蛋白结合测定

[0284] 将 25 μ l 以 PBS 稀释的 1 μ g/ml 纤连蛋白 (R & D Systems) 添加至 384 孔板 (Nucn MaxiSorp) 的孔中且在 2-8℃ 下孵育过夜。以 80 μ l PBT 缓冲液洗涤板 3 次。向所有孔中添加 50 μ l PBS/1% BSA 在室温下在轻微搅动下孵育板至少 60 分钟, 随后以 80 μ l PBT 缓冲液洗涤 3 次。

[0285] 将抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体 (30 μ g/mL) 以 1 : 3 连续稀释 11 次。向 0.65mL 微管中添加 50 μ l 连续稀释的抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体且在室温下在轻微搅动下与 50 μ l 含 200ng/mL $\alpha 5 \beta 1$ (R & D Systems) 的 ELISA 缓冲液 (150mM NaCl、10mM Tris, pH 7.5, 5mg/mL BSA、1mM $MnCl_2$) 预混合 (1 : 1) 60 分钟。将 25 μ l 预混合的 $\alpha 5 \beta 1$ 及抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体添加至经纤连蛋白包被的孔中且在室温下在轻微搅动下孵育板 60 分钟。以 PBT 缓冲液洗涤板 6 次, 将含 100ng/mL 抗- $\beta 1$ -生物素的 ELISA 缓冲液添加至各孔中且在室温下在轻微搅动下孵育板 60 分钟。以 80 μ l PBT 缓冲液洗涤板 6 次, 向各孔中添加 25 μ l 链霉亲和素 (Streptavidin)-HRP (于 ELISA 缓冲液中 1 : 50,000, GE Healthcare), 且在室温下在轻微搅动下孵育板 60 分钟。以 80 μ l PBT 缓冲液洗涤板 6 次, 向各孔中添加 25 μ l TMB 底物 (Kirkgaard and Perry Laboratories), 在室温下孵育板约 6 分钟, 且以 25 μ l 的 1M 磷酸终止反应。在 450nm 下读取吸光度, 按照上文 B 部分中所述分析 IC_{50} 值。

[0286] D. HUVEC 迁移分析

[0287] 使 HUVEC 细胞在标准培养基中生长至 80% 汇合。以胰蛋白酶处理细胞, 对其计数,

使其以每毫升 5×10^5 个细胞的浓度再悬浮于含有 0.1% BSA 的 EBM-2 培养基中。为进行测定,将 $100 \mu\text{l}$ 细胞 (每孔 5×10^4 个细胞) 涂布于 BD Falcon HTS 多孔系统 24 孔 (BD Ref: 351185, 孔径 $8 \mu\text{m}$) 的各孔中。以纤连蛋白 ($1-2 \mu\text{g/ml}$) 预先包被 HTS 板过夜。以 PBS 洗涤板且向底部腔室中添加 $500 \mu\text{l}$ (含有 0.1% BSA 的 EBM) 溶液。每个样品使用 3-6 个孔。不向阴性对照孔中添加迁移刺激物 (例如 VEGF)。

[0288] 为开始分析,将 $100 \mu\text{l}$ 细胞 (每孔 5×10^4 个细胞) 添加至上部腔室中。下部腔室含有 $500 \mu\text{l}$ 培养基 (含有 0.1% BSA 的 EBM)。在将迁移刺激物 (VEGF) 添加至下部腔室之前,一般向上部腔室中添加抗整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体及同种型对照物,使得细胞最终浓度是 $0 \mu\text{g/ml}$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$ 或 $5 \mu\text{g/ml}$,并孵育 15 分钟。

[0289] 将刺激物添加至下部腔室中 (10ng/ml VEGF-A),并孵育板 4-6 小时或过夜。使用海绵刷自上部腔室擦除细胞,添加 PBS,随后再次自上部腔室擦除细胞。自下部腔室排出培养基且以 $500 \mu\text{l}$ 的 100% 甲醇将细胞固定 5 分钟。

[0290] 随后以 $500 \mu\text{l}$ SYTOX®Green 核酸染色剂 (用 PBS 以 1 : 5000 或 1 : 10000 稀释) (Molecular Probes S7020) 将细胞染色至少 10 分钟 (在黑暗中)。随后,使用显微镜获取各孔的单个照片。使用 Axio Vision AC 程序及 5 倍物镜获取照片。

[0291] 使用 ImageJ 分析结果 (最小 5 个像素, bin 5)。记录每孔的细胞数目且使用 Microsoft Excel 分析。

[0292] 实施例 2 :抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体的产生

[0293] 通过用重组人类 $\alpha 5 \beta 1$ 细胞外结构域多肽使仓鼠免疫来产生抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体。选择包含图 1 及图 2 中所述的 VH 及 VL 序列的仓鼠单克隆抗体克隆 18C12。

[0294] 通过将来自仓鼠 18C12 的轻链克隆至两个共同 VL_{kappa1}/VH_{III} 构架 h18C12.v1.1 和 h18C12.v2.1 (其仅 CDR-H3 接触区不同),来产生两种形式的嵌合仓鼠 18C12, h18C12.v1.1 和 h18C12.v2.1。特别地, h18C12.v1.1 的 CDR-H3 接触区包含以下残基 : $C^{92}A^{93}R^{94}$, 并且 h18C12.v2.1 的 CDR-H3 接触区包含以下残基 : $C^{92}T^{93}S^{94}$ 。h18C12.v1.1 与 h18C12.v2.1 均成功地以 Fab 形式展示于噬菌体上且通过噬菌体竞争 ELISA 观察结合。h18C12.v1.1 与 h18C12.v2.1 之间在结合方面没有观察到显著差异。选择 h18C12.v1.1 进行进一步人源化。通过将 h18C12.v1.1 的大多数轻链构架变成人类共有 λ IV 构架 (除轻链中的以下残基以外 :Y36、A43 及 Y49),从而产生人源化 18C12.v3。另外,保留人类 VH_{III} 构架中的以下残基 G49 及 D73。

[0295] h18C12.v3 经亲和力成熟并产生以下克隆 :h18C12.v6 ;h18C12.v7 ;h18C12.v9 ;h18C12.v15 ;h18C12.v16 ;h18C12.v28 ;h18C12.v30 ;h18C12.v51 ;h18C12.v54 ;h18C12.v70 ;h18C12.v78。各克隆的 CDR 序列描述于图 3 中。h18C12.v6 克隆的 CDR 序列经如下修饰 :CDR-L2 :D50cS 及 D56S ;CDR-H1 :N31A ;和 CDR-H2 :N53A。随后将经修饰的 CDR 序列插入经修饰的人类 λ III//VHIII 构架中以产生 h18C12.v6.1Lam3(h18C12.v6.1) 和 h18C12.v6.2Lam3(h18C12.v6.2)。h18C12.v6.1 的经修饰人类 λ III 构架含有以下修饰 :L46Y ;V47L ;I48M ;N69A ;A71R ;和 G77N。h18C12.v6.2 的经修饰人类 λ III 构架含有以下修饰 :N69A ;A71R ;和 G77N。经修饰 VHIII 构架含有以下修饰 :S49G 和 N73D。

[0296] 克隆 h18C12.v6.1 经进一步修饰以移除 CDR-L2 ($N^{50a}S^{50b}S^{50c}G^{50d}$) 中的天冬酰胺 (N)。产生以下克隆 :h18C12.v6.1.1 ;h18C12.v6.1.2 ;h18C12.v6.1.3 ;h18C12.v6.1.4 和

h18C12.v6.1.5。各 h18C12.v6.1 克隆的位置 50a、50b、50c 及 50d 处的 CDR-L2 序列描述于图 7 中。

[0297] 实施例 3:噬菌体竞争 ELISA

[0298] 将 MAXISORP™ 微量滴定盘以 5 μg/ml 含重组人类整合素 α₅β₁ (R&D) 的 PBS 包被过夜,随后在室温下以 PBST 缓冲液 (含 0.5% BSA 及 0.05% Tween 20 的 PBS) 封闭一小时。将来自培养物上清液的噬菌体与以 PBST 缓冲液连续稀释的人类整合素 α₅β₁ 一起在组织培养微量滴定板中培养 1 小时,其后将 80 μl 混合物转移至靶标包被孔中,维持 15 分钟来捕捉未经结合的噬菌体。以 PBT 缓冲液 (含 0.05% Tween 20 的 PBS) 洗涤板,且添加 HR 缀合的抗 M 13 (Amersham Pharmacia Biotech) (1 : 5000 于 PBST 缓冲液中) 历时 40 分钟。以 PBT 缓冲液洗涤板且通过添加四甲基联苯胺底物 (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) 显影。绘制 450nm 下的吸光度随溶液中靶标浓度而变化的函数来测定噬菌体 IC₅₀。其用作对噬菌体表面上呈现的 Fab 克隆的亲和力估算值。图 4 描绘噬菌体竞争测定的结果,其显示亲和力成熟 18C12 变体 h18C12.v3、h18C12.v6、h18C12.v7、h18C12.v9、h18C12.v15、h18C12.v16、h18C12.v28、h18C12.v30、h18C12.v51、h18C12.v54、h18C12.v70 及 h18C12.v78 与人类 α₅β₁ 整合素的结合。

[0299] 实施例 4:通过 BIAcore 进行的抗体亲和力测定

[0300] 为测定嵌合 18C12、h18C12.v6.1、h18C12.v6.1.1、h18C12.v6.1.2、h18C12.v6.1.3、h18C12.v6.1.4、h18C12.v6.1.5 IgGs 的结合动力学及亲和力,使用如实施例 1 中所述利用 BIAcore™-3000 仪器进行的表面等离子共振 (SRP) 测量。

[0301] 图 5 描绘对亲和力成熟 18C12 变体与人类 α₅β₁ 整合素的结合的 BIAcore 分析的结果。图 6 描绘对嵌合 18C12 (包含图 1 中所述的仓鼠 VL 及 VH 序列及 IgG1 的 Fc 部分的 18C12) 及 h18C12.v6.1 与人类 α₅β₁ 整合素的结合的 BIAcore 分析的结果。数据表明 h18C12.v6.1 对人类 α₅β₁ 整合素的结合亲和力比仓鼠 18C12 对人类 α₅β₁ 整合素的结合亲和力高大约 2 倍。图 7 描绘各 h18C12.v6.1 克隆的 BIAcore 分析的结果。

[0302] 实施例 5:18C12 抗体抑制与纤连蛋白的结合

[0303] 为比较嵌合 18C12 与 h18C12.v6.1 或 h18C12.v6.1.5IgG 对于与纤连蛋白结合的作用,使用上文实施例 1 中所述的纤连蛋白结合测定。图 8 描绘了比较嵌合 18C12 与 h18C12.v6.1 在干扰 U937 细胞与纤连蛋白结合方面的能力的纤连蛋白结合测定的结果。图 9 描绘比较仓鼠 18C12 与 h18C12.v6.1.5 在干扰 U937 细胞与纤连蛋白结合方面的能力的纤连蛋白结合测定的结果。图 10 描绘比较仓鼠 18C12 与 h18C12.v6.1.5 在干扰重组的 α₅β₁ 细胞外结构域与纤连蛋白结合方面的能力的纤连蛋白结合测定的结果。数据表明仓鼠 18C12、嵌合 18C12、h18C12.v6.1 及 h18C12.v6.1.5 抑制 U937 细胞或重组 α₅β₁ 细胞外结构域与纤连蛋白的结合。

[0304] 实施例 6:18C12 抗体抑制 HUVEC 迁移

[0305] 为比较嵌合 18C12 与 h18C12.v6.1IgG 在 HUVEC 细胞上的迁移作用,使用上文实施例 1 中所述的 HUVEC 迁移测定。

[0306] 图 11 描绘比较嵌合 18C12 与 h18C12.v6.1 在干扰 HUVEC 细胞在纤连蛋白上迁移方面的能力的 HUVEC 迁移测定的结果。数据表明,嵌合 18C12 和 h18C12.v6.1 抑制 HUVEC 细胞在纤连蛋白上的迁移。

[0307] 实施例 7: 胚胎发育测定

[0308] 在胚胎发育测定中使用表达嵌合 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素 (人类 $\alpha 5$ 及鼠 $\beta 1$) 的 $\alpha 5$ 转基因小鼠来证明本文所述的 18C12 抗体的功效。使表达人类 $\alpha 5$ 且不表达鼠 $\alpha 5$ 的雄性转基因小鼠与不表达人类 $\alpha 5$ 并且鼠 $\alpha 5$ 杂合的雌性小鼠交配。在交配后第 9.5 天开始每周两次向怀孕小鼠腹腔内注射 10mg/kg 抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体 (h18C12.v6.1.5) 或阴性对照抗体。在交配后地第 14.5 天, 采集胚胎, 基因定型, 并评估胚胎血管结构。结果总结于下表中。

[0309]

处理	整合素 $\alpha 5$ 表达	血管发育
h18C12.v6.1.5	仅人类 $\alpha 5$	出血、发育迟缓和广泛性全身性水肿
h18C12.v6.1.5	仅鼠 $\alpha 5$	正常
阴性对照抗体	仅人类 $\alpha 5$	正常
阴性对照抗体	仅鼠 $\alpha 5$	正常

[0310] 这些结果表明结果表明 h18C12.v6.1.5 在血管发育期间体内破坏 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素功能。

[0311] 实施例 8: 肿瘤同种异体移植测定

[0312] 在研究中使用 C57/B16 同种异体移植肿瘤模型来证明本文所述 18C12 抗体的功效。将 C57/B16 肿瘤细胞植入鼠 $\alpha 5$ 基因敲除的人类 $\alpha 5$ 转基因小鼠内且用抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体处理小鼠。

[0313] 将带有已确定肿瘤的小鼠随机分成四组, 使得所有组具有类似的初始肿瘤体积。给药方案如下:

[0314] (1) 阴性对照抗体 (13.5mg/kg, 每周 2 次)

[0315] (2) 抗 VEGF 抗体 (3.5mg/kg, 每周 2 次) + 阴性对照抗体 (10mg/kg, 每周 2 次)

[0316] (3) 阴性对照抗体 (3.5mg/kg, 每周 2 次) + 抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体 (18C12) (10mg/kg, 每周 2 次)

[0317] (4) 抗 VEGF 抗体 (3.5mg/kg, 每周 2 次) + 抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体 (18C12) (10mg/kg, 每周 2 次)。

[0318] 使用卡钳每周测量肿瘤的长度和宽度两次, 且使用下述公式计算肿瘤体积: 肿瘤体积 (mm^3) = $(w^2 \times l) / 2$, 其中 w = 宽度, 且 l = 长度, 以 mm 计算。绘制肿瘤体积对时间的曲线以反映肿瘤的生长速率。

[0319] 实施例 9: 肿瘤异种移植研究

[0320] 在研究中使用肿瘤异种移植研究来证明本文中所述 18C12 抗体的功效。将具有荧光素酶报导基因的人类 U87 神经胶质瘤细胞植入裸鼠脑中, 并用抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗体处理小鼠。

[0321] 使用生物发光成像使带有已确立肿瘤的小鼠成像并且随机分成三组, 使得所有组具有类似的初始肿瘤负荷。给药方案如下:

[0322] (1) 阴性对照抗体 (豕草) (5mg/kg, 每周 2 次) + 抗 gD (10mg/kg, 每周 2 次)

[0323] (2) 抗 VEGF 抗体 (B20-4.1) (5mg/kg, 每周 2 次)+ 阴性对照抗体抗 gD (10mg/kg, 每周 2 次)

[0324] (3) 抗 VEGF 抗体 (B20-4.1) (5mg/kg, 每周 2 次)+ 抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体 (h18C12.v6.1.5) (10mg/kg, 每周 2 次)。

[0325] 在手术植入肿瘤细胞后每天监测这些小鼠的存活。用抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体 h18C12.v6.1.5 与抗 VEGF 组合处理相对于单独抗 VEGF 来说, 显著提高小鼠的存活率。结果展示于图 12 中。也在植入后第 1 周、第 3 周、第 4 周及第 5 周使用生物发光成像测量肿瘤负荷。用抗 $\alpha 5 \beta 1$ 抗体 h18C12.v6.1.5 与抗 VEGF 组合处理的小鼠相对于仅用抗 VEGF 处理的小鼠肿瘤负荷降低。结果展示于图 13 中。

[0326] 本文中引用的所有出版物 (包括例如专利、已公开专利申请及 Genbank 登录号) 为所有目的以全文引用的方式并入本文中, 其引用程度与各参考文献特定地并且个别地以引用的方式并入相同。

[0001]

序列表

- <110> 健泰科有限公司
梁伟庆
格雷戈里·D·普洛曼
吴岩
叶蔚蓝
- <120> 新型抗- α 5 β 1抗体及其应用
- <130> P4170R1 WO
- <150> US 61/163, 241
<151> 2009-03-25
- <160> 40
- <210> 1
<211> 110
<212> PRT
<213> 人源化的
- <220>
<221> 变体
<222> 22-36
<223> X是任何氨基酸
- <220>
<221> 不确定
<222> 22-36, 52-62, 95-105
<223> 未知氨基酸
- <220>
<221> 变体
<222> 52-62
<223> X是任何氨基酸
- <220>
<221> 变体
<222> 95-105
<223> X是任何氨基酸
- <400> 1
Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Arg Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45
Pro Val Leu Val Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60
Xaa Xaa Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn
65 70 75
Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala
80 85 90
Asp Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
95 100 105
Phe Gly Gly Gly Thr
110
- <210> 2
<211> 106
<212> PRT
<213> 灰仓鼠 (*Cricetulus griseus*)
- <400> 2
Gln Pro Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

[0002]

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

Thr

<210> 3
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人源化的

<400> 3
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asn Ser Val Lys Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Thr Ile Gly Trp Tyr Gln Gln His Pro Asp Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Tyr Val Met Tyr Leu Asn Ser Asp Gly Ser His Asn Lys Gly Asp
 50 55 60
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala His Arg
 65 70 75
 Tyr Leu Ser Ile Ser Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 80 85 90
 Phe Cys Gly Ser Ser Tyr Ser Ser Gly Tyr Val Phe Gly Ser Gly
 95 100 105

Thr

<210> 4
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人源化的

<400> 4
 Glu Pro Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Thr Ile Gly Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Arg
 35 40 45
 Tyr Leu Met Tyr Leu Asn Ser Asp Gly Ser His Asn Lys Gly Asp
 50 55 60
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg
 65 70 75
 Tyr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 80 85 90
 Tyr Cys Gly Ser Ser Tyr Ser Ser Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly
 95 100 105

[0003]

Thr

<210> 5
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人源化的

<400> 5

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

Thr

<210> 6
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人源化的

<400> 6

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

Thr

<210> 7
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人源化的

<400> 7

Ser	Ser	Glu	Leu	Thr	Gln	Asp	Pro	Ala	Val	Ser	Val	Ala	Leu	Gly
1				5					10					15
Gln	Thr	Val	Arg	Ile	Thr	Cys	Thr	Leu	Ser	Ser	Gln	His	Ser	Thr
				20					25					30
Tyr	Thr	Ile	Gly	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val

[0004]

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

Thr

<210> 8
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人源化的

<400> 8
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Thr Ile Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
 35 40 45
 Tyr Leu Met Tyr Leu Asn Ser Asp Ser Ser His Asn Lys Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Thr Arg
 65 70 75
 Ser Leu Thr Ile Thr Asn Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 80 85 90
 Tyr Cys Ala Ala Tyr Tyr Ala Tyr Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly
 95 100 105

Thr

<210> 9
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 灰仓鼠(*Cricetulus griseus*)

<400> 9
 Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Asn Arg Trp Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Gly Ile Lys Thr Lys Pro Asn Ile Tyr Ala Thr
 50 55 60
 Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 65 70 75
 Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Val
 80 85 90
 Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr Ser Leu Thr Gly Met Arg
 95 100 105
 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 110

[0005]

<210> 10
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人源化的

 <220>
 <221> 变体
 <222> 26-35
 <223> X是任何氨基酸

 <220>
 <221> 不确定
 <222> 26-35, 52-70, 103-111
 <223> 未知氨基酸

 <220>
 <221> 变体
 <222> 52-70
 <223> X是任何氨基酸

 <220>
 <221> 变体
 <222> 103-111
 <223> X是任何氨基酸

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

 <210> 11
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 人源化的

 <400> 11
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Asn Arg Trp Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Gly Ile Lys Thr Lys Pro Asn Ile Tyr Ala Thr
 50 55 60
 Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 65 70 75
 Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 80 85 90
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Gly Met Arg
 95 100 105

[0006]

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 110

<210> 12
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 人源化的

<400> 12
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Asn Arg Trp Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Gly Ile Lys Thr Lys Pro Asn Ile Tyr Ala Thr
 50 55 60
 Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 65 70 75
 Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 80 85 90
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Gly Met Lys
 95 100 105

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 110

<210> 13
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 人源化的

<400> 13
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Ala Arg Trp Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Gly Ile Lys Thr Lys Pro Ala Ile Tyr Ala Thr
 50 55 60
 Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 65 70 75
 Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 80 85 90
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Gly Met Lys
 95 100 105

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 110

<210> 14
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 人源化的

<400> 14
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Ala Arg Trp Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

[0007]

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

<210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<220>
 <221> 变体
 <222> 3
 <223> X是S或T

<220>
 <221> 变体
 <222> 4
 <223> X是S, P或T

<220>
 <221> 变体
 <222> 5
 <223> X是Q或N

<220>
 <221> 变体
 <222> 7
 <223> X是F或S

<220>
 <221> 变体
 <222> 8
 <223> X是T或I

<220>
 <221> 变体
 <222> 10
 <223> X是K或T

<220>
 <221> 变体
 <222> 12
 <223> X是G, D或S

<400> 15
 Thr Leu Xaa Xaa Xaa His Xaa Xaa Tyr Xaa Ile Xaa
 5 10

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<220>
 <221> 变体
 <222> 1
 <223> X是L或I

<220>

[0008]

<221> 变体
 <222> 6
 <223> X是S, Y或T

<220>
 <221> 变体
 <222> 9
 <223> X是V或I

<400> 17
 Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Gly Tyr Xaa
 5

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<220>
 <221> 变体
 <222> 6
 <223> X是N或A

<220>
 <221> 变体
 <222> 9
 <223> X是I或V

<400> 18
 Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Arg Trp Xaa Tyr
 5 10

<210> 19
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<220>
 <221> 变体
 <222> 7
 <223> X是N, A或T

<220>
 <221> 变体
 <222> 8
 <223> X是I或R

<220>
 <221> 变体
 <222> 12
 <223> X是E或Q

<400> 19
 Gly Ile Lys Thr Lys Pro Xaa Xaa Tyr Ala Thr Xaa Tyr Ala Asp
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Gly

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<220>
 <221> 变体
 <222> 1
 <223> X是L或V

[0010]

<220>
 <221> 变体
 <222> 4
 <223> X是M或K

<220>
 <221> 变体
 <222> 5
 <223> X是R或K

<400> 20
 Xaa Thr Gly Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr
 5

<210> 21
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 21
 Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Gly
 5 10

<210> 22
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 22
 Thr Leu Ser Pro Gln His Phe Thr Tyr Lys Ile Asp
 5 10

<210> 23
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 23
 Thr Leu Ser Ser Asn His Ser Ile Tyr Thr Ile Ser
 5 10

<210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 24
 Thr Leu Thr Thr Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Gly
 5 10

<210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

<400> 25
 Leu Asn Ser Asp Gly Ser His Asn Lys Gly Asp
 5 10

<210> 26
 <211> 11

[0011]

- <400> 32
Gly Ser Ser Tyr Ser Thr Gly Tyr Val
5
- <210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 序列是合成的
- <400> 33
Gly Ala Ser Tyr Ser Ser Gly Tyr Ile
5
- <210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 序列是合成的
- <400> 34
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Arg Trp Ile Tyr
5 10
- <210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 序列是合成的
- <400> 35
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Arg Trp Val Tyr
5 10
- <210> 36
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 序列是合成的
- <400> 36
Gly Ile Lys Thr Lys Pro Asn Ile Tyr Ala Thr Glu Tyr Ala Asp
1 5 10 15
Ser Val Lys Gly
- <210> 37
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 序列是合成的
- <400> 37
Gly Ile Lys Thr Lys Pro Thr Arg Tyr Ala Thr Gln Tyr Ala Asp
1 5 10 15
Ser Val Lys Gly
- <210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>

[0013]

<223> 序列是合成的

<400> 38

Leu Thr Gly Met Arg Tyr Phe Asp Tyr
5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 39

Leu Thr Gly Met Lys Tyr Phe Asp Tyr
5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 40

Val Thr Gly Met Arg Tyr Phe Asp Tyr
5



图 2

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40	
仓鼠18C12	E	V	H	L	V	E	S	G	G	D	L	V	Q	P	G	S	S	L	K	L	S	C	A	A	S	C	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y		W	V	R	Q	A	
hum VH III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	S	L	R	L	S	C	A	A	S	C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	W	N	W	V	R	Q	A
h18C12.v3	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	S	L	R	L	S	C	A	A	S	C	F	F	F	S	N	R	W	I	Y		W	V	R	Q	A		
h18C12.v6	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	S	L	R	L	S	C	A	A	S	C	F	F	F	S	N	R	W	I	Y		W	V	R	Q	A		
h18C12.v6.1.Lam3	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	S	L	R	L	S	C	A	A	S	C	F	F	F	S	A	R	W	I	Y		W	V	R	Q	A		
h18C12.v6.2.Lam3	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	S	L	R	L	S	C	A	A	S	C	F	F	F	S	A	R	W	I	Y		W	V	R	Q	A		
h18C12.v6.1.5	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	S	L	R	L	S	C	A	A	S	C	F	F	F	S	A	R	W	I	Y	-	W	V	R	Q	A		

Kabat - CDR H1

Chothia - CDR H1

Contact - CDR H1

图 2A

克隆	CDR-L1										CDR-L2										CDR-L3															
	24	25	26	27	A	28	29	30	31	32	33	34	50	A	B	C	D	G	S	H	N	K	G	D	25	89	90	91	92	93	94	95	96	97		
h18C12.v3	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	Y	S	S	S	G	Y	V	29
h18C12.v6	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	A	A	Y	Y	A	Y	G	Y	V	30	
h18C12.v7	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	Y	S	Y	Y	S	G	Y	V	31	
h18C12.v9	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	Y	S	T	G	Y	V	32	
h18C12.v15	T	L	S	P	Q	H	F	F	Y	K	I	D	22	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	
h18C12.v16	T	L	S	S	N	H	S	I	Y	T	I	S	23	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	
h18C12.v28	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	A	S	Y	S	S	G	Y	I	33	
h18C12.v30	T	L	T	T	Q	H	S	T	Y	T	I	G	24	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	
h18C12.v51	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	
h18C12.v54	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	I	N	S	D	G	S	H	K	K	G	V	26	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	
h18C12.v70	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	T	S	H	G	L	H	Q	K	G	V	27	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	
h18C12.v78	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	N	S	D	S	T	Y	-	T	A	V	28	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	

克隆	CDR-H1										CDR-H2										CDR-H3																				
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	95	96	97	98	99	100	A	101	102			
h18C12.v3	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38
h18C12.v6	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	K	Y	F	D	Y	39
h18C12.v7	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38
h18C12.v9	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38
h18C12.v15	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38
h18C12.v16	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38
h18C12.v28	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	V	T	G	M	R	Y	F	D	Y	40
h18C12.v30	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38
h18C12.v51	G	F	T	F	S	N	R	W	V	Y	35	G	I	K	T	K	P	T	R	Y	A	T	Q	Y	A	D	S	V	K	G	37	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38
h18C12.v54	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38
h18C12.v70	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38
h18C12.v78	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	34	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	36	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	38

图 3

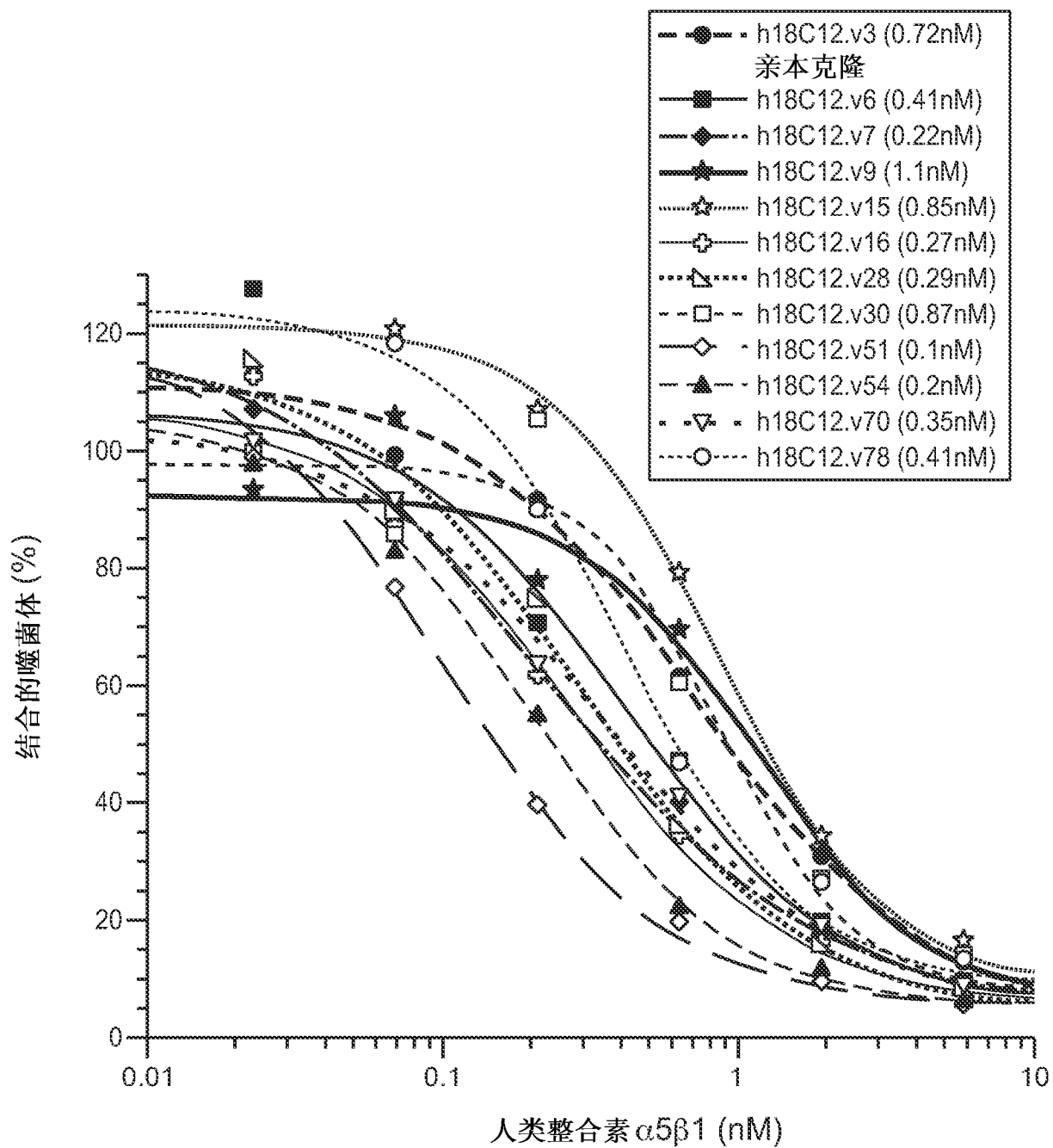


图 4

抗- $\alpha 5\beta 1$ hIgG BIAcore 分析 (配体: hIgG; 分析物: $\alpha 5\beta 1$)			
抗- $\alpha 5\beta 1$	人类整合素 $\alpha 5\beta 1$ (R&D)		
	$k_{on}(10^5 M^{-1}S^{-1})$	$k_{off}(10^{-4} S^{-1})$	Kd(nM)
h18C12.v3	0.71 ± 0.08	8.07 ± 0.37	11.5 ± 1.1
h18C12.v6	1.74 ± 0.51	7.50 ± 1.64	4.8 ± 2.1
h18C12.v15	2.23 ± 0.09	15.2 ± 0.5	6.9 ± 0.3
h18C12.v54	0.63 ± 0.11	7.34 ± 0.32	11.9 ± 2.4
h18C12.v70	0.66 ± 0.19	12.8 ± 0.8	20.3 ± 3.8

图 5

抗- $\alpha 5\beta 1$ hIgG BIAcore 总结 (配体: hIgG; 分析物: $\alpha 5\beta 1$)			
抗体	人类整合素 $\alpha 5\beta 1$ (R&D)		
	$k_{on}(10^5 M^{-1}S^{-1})$	$k_{off}(10^{-4} S^{-1})$	Kd(nM)
h18C12.v6.1.Lam3	0.97 ± 0.03	3.86 ± 0.24	4.00 ± 0.32
嵌合 18C12	1.2 ± 0.1	9.22 ± 0.19	7.68 ± 0.53

图 6

抗- $\alpha 5\beta 1$ h18C12.v6.1 变体	CDR-L2				人类整合素 $\alpha 5\beta 1$ (R&D)		
	50a	50b	50c	50d	$k_{on}(10^5 M^{-1}S^{-1})$	$k_{off}(10^{-4} S^{-1})$	Kd(nM)
h18C12.v6.1.1	S	S	S	G	1.2	32	26.7
h18C12.v6.1.2	N	S	D	G	0.48	6.43	13.5
h18C12.v6.1.3	N	S	A	G	1.1	40	36.4
h18C12.v6.1.4	N	S	D	A	0.46	14.4	31.6
h18C12.v6.1.5	N	S	D	S	0.43	6.59	15.5

图 7

U937 细胞与纤连蛋白结合

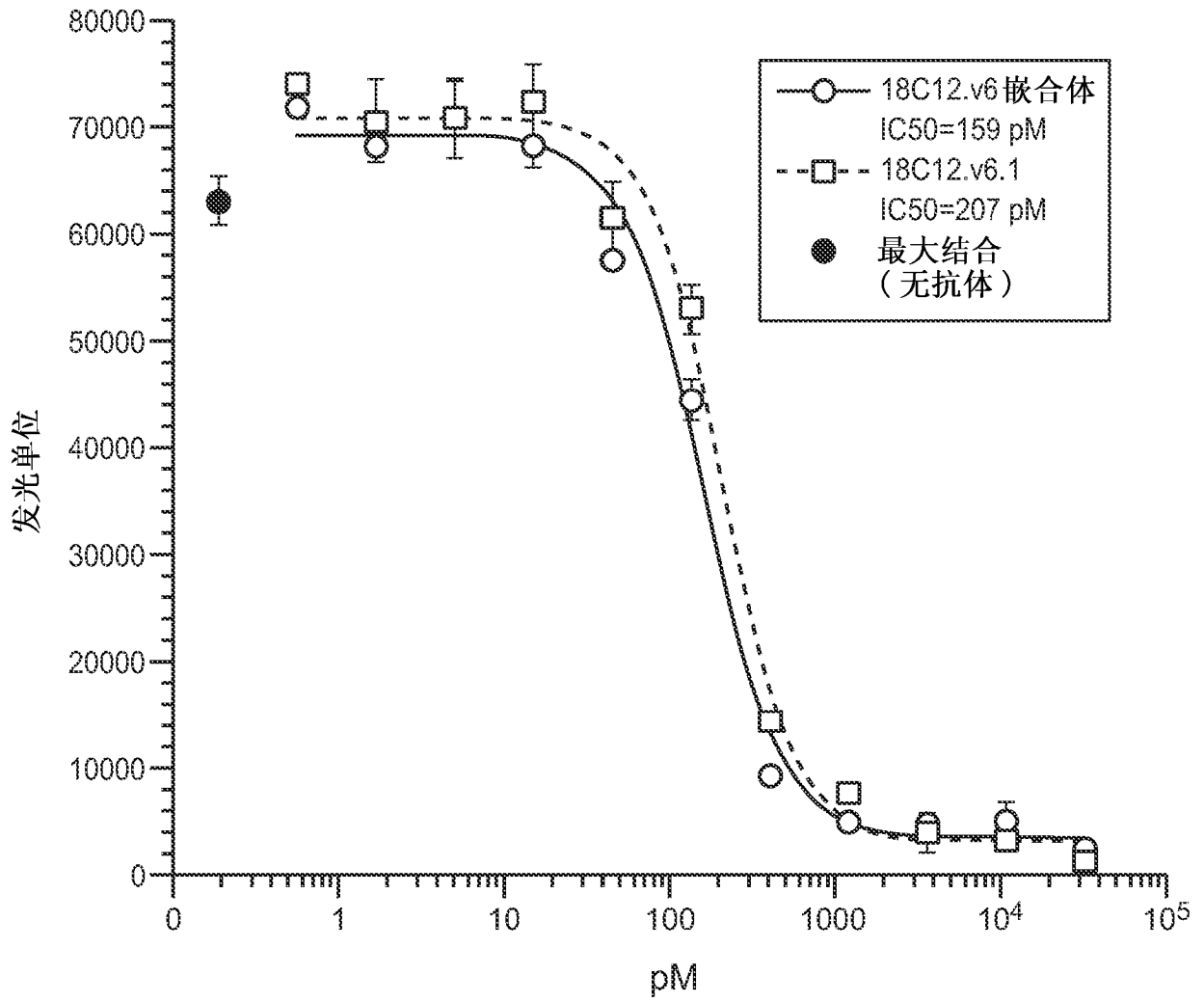


图 8

U937 细胞与纤连蛋白结合

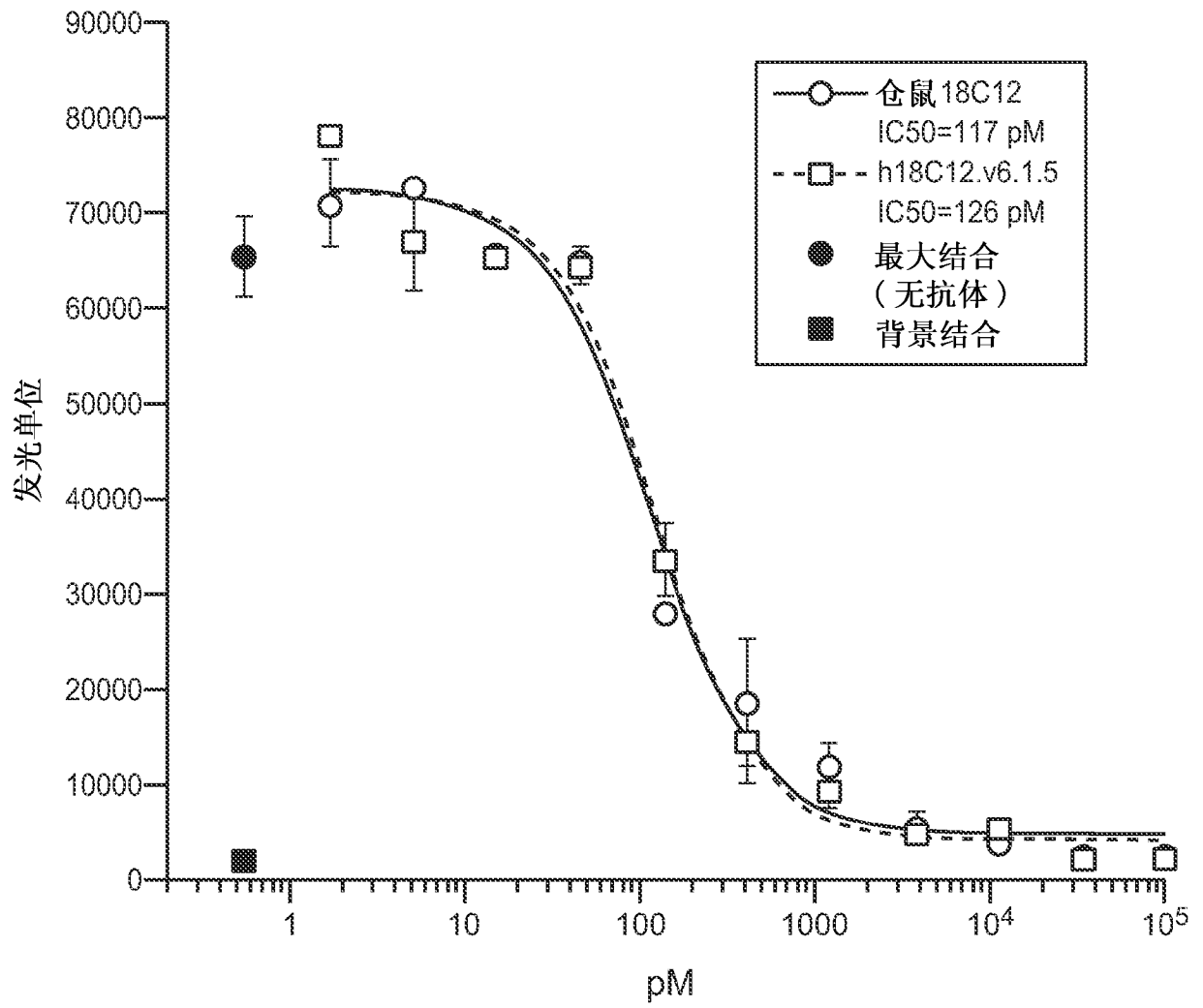


图 9

$\alpha 5 \beta 1$ 与纤连蛋白结合

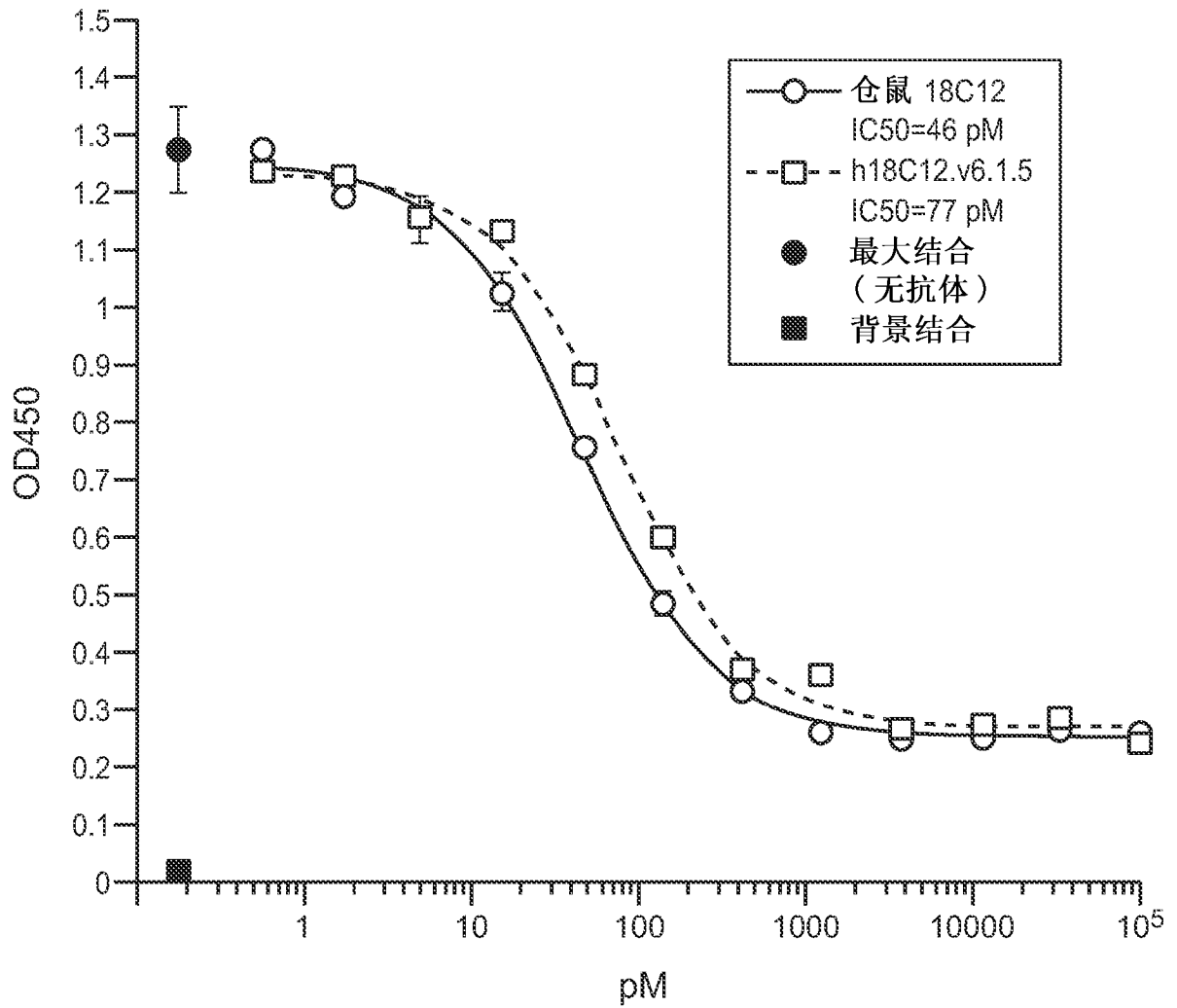


图 10

抗体存在时 HUVEC 在纤连蛋白上的迁移

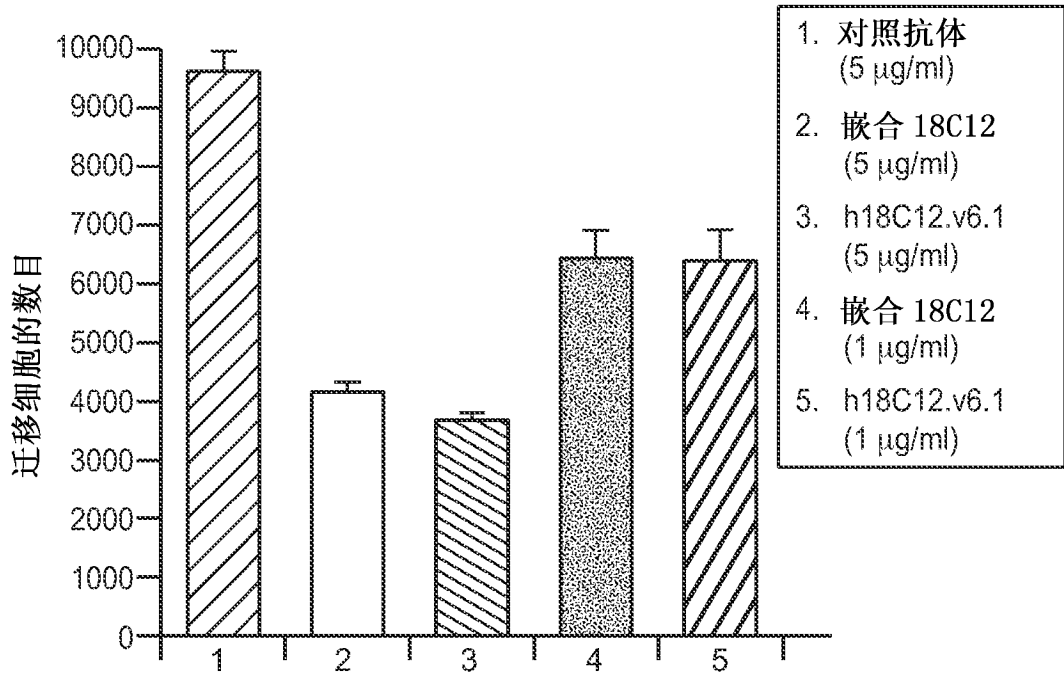


图 11

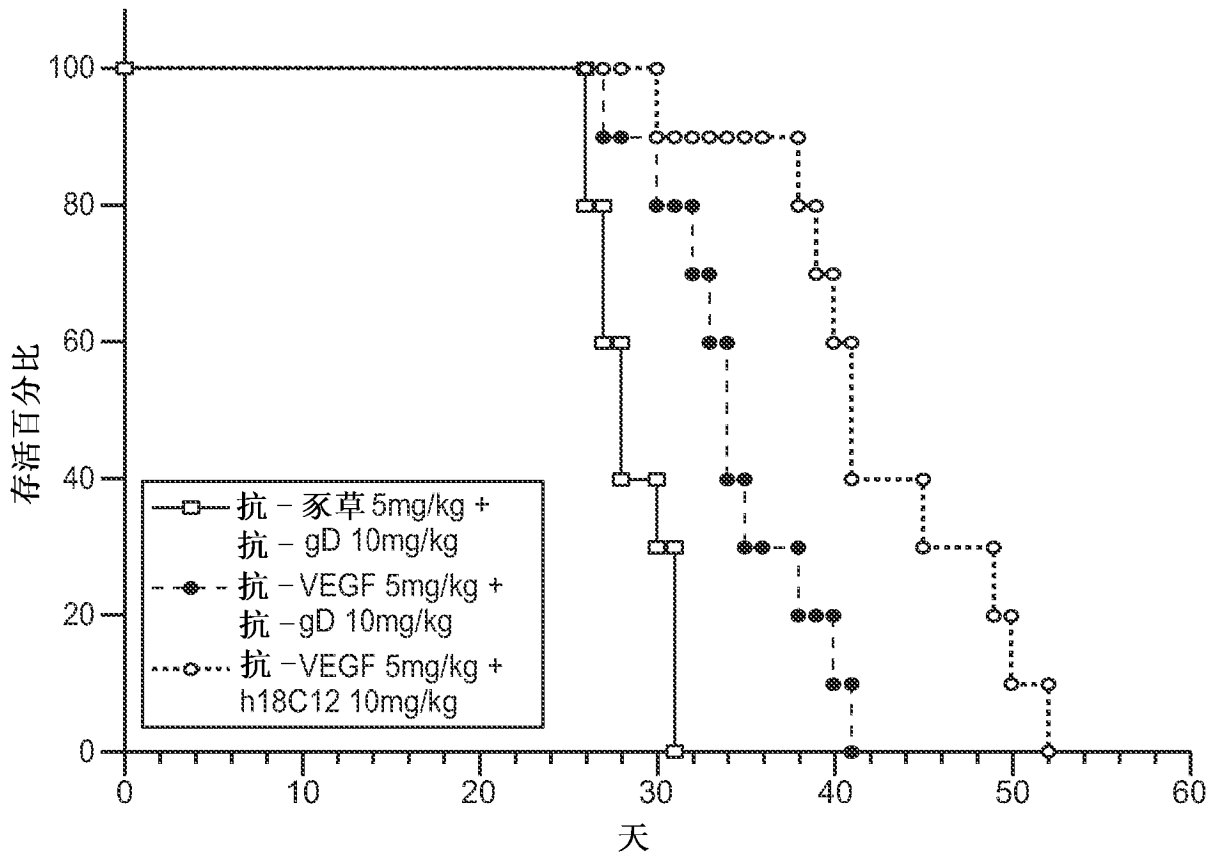


图 12

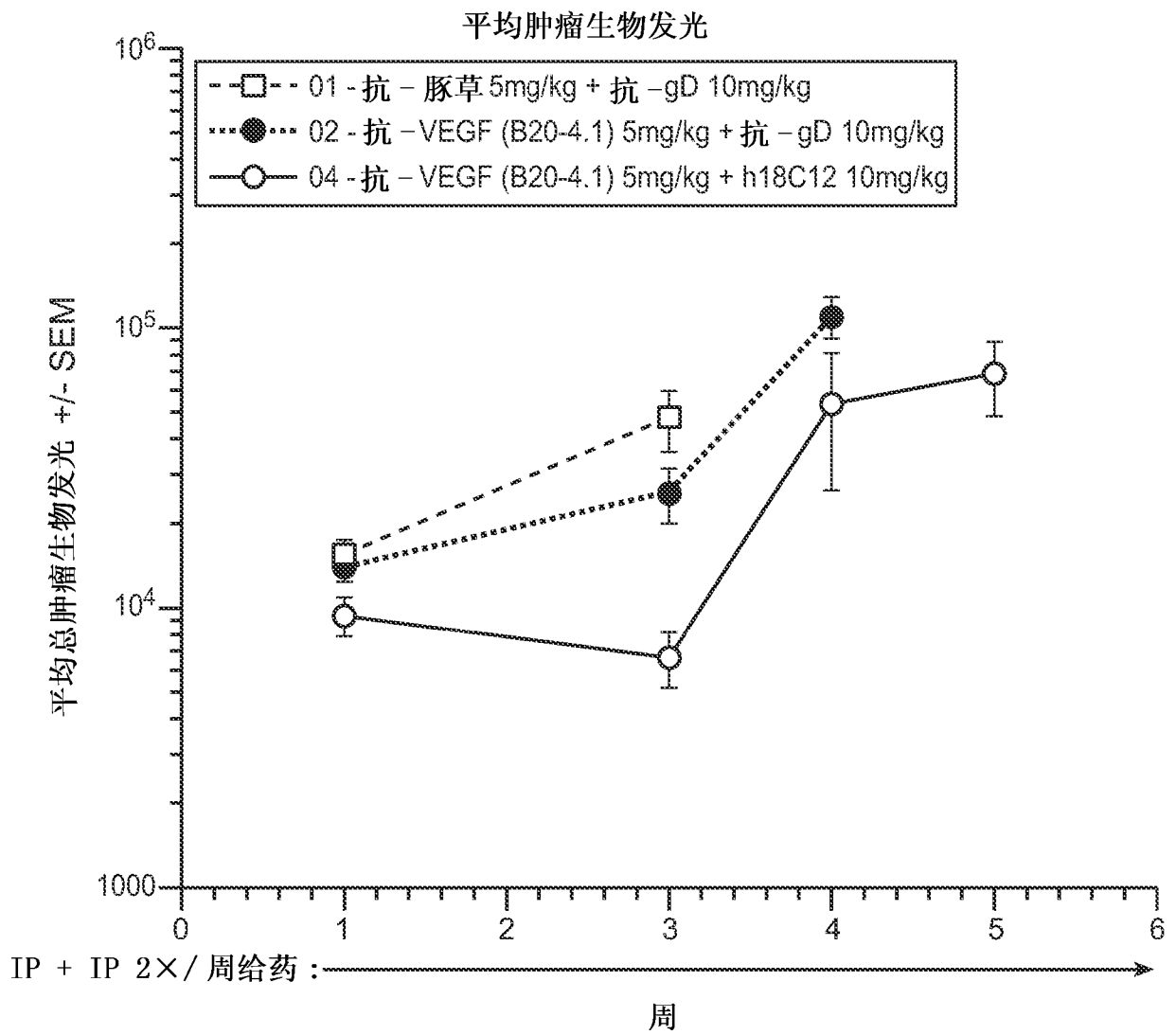


图 13