



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1468307 B

(45) 授权公告日 2010.04.28

(21) 申请号 01816938.4

C12N 5/10(2006.01)

(22) 申请日 2001.08.07

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/42(2006.01)

(30) 优先权数据

G01N 33/50(2006.01)

60/223,363 2000.08.07 US

G01N 33/577(2006.01)

09/920,267 2001.08.01 US

A61P 37/00(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2003.04.07

WO 031248 A, 2000.06.02, 权利要求 1-7, 9-15, 28, 19.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2001/024784 2001.08.07

审查员 罗霄

(87) PCT申请的公布数据

W002/12501 EN 2002.02.14

(73) 专利权人 森托科尔公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 J·吉勒斯-科马尔 G·希夫纳

L·斯奈德 M·特里克哈

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 温宏艳 刘玥

(51) Int. Cl.

C12N 15/13(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

C12N 15/79(2006.01)

权利要求书 4 页 说明书 68 页 附图 30 页

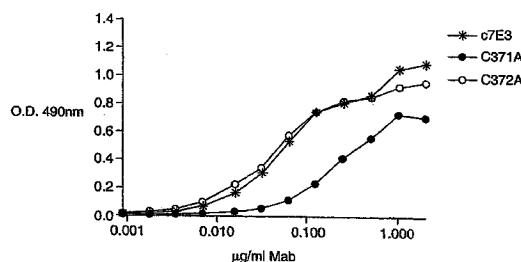
(54) 发明名称

抗双整联蛋白抗体、组合物、方法和用途

(57) 摘要

本发明涉及至少一种新颖的抗双整联蛋白抗体,包括编码至少一种抗双整联蛋白抗体的分离核酸、双整联蛋白、载体、宿主细胞、转基因动物或植物、及其制备方法和用途。

GenPharm Mabs 与  $\alpha V\beta 3$  的结合



1. 一种分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分特异性地结合  $\alpha V\beta 3$  和  $\alpha V\beta 5$  整联蛋白的人  $\alpha V$  整联蛋白链,所述分离的人单克隆抗体包含含有 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR4 和 FR4 序列的重链可变区以及含有 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR4 和 FR4 序列的轻链可变区,其中:(a) 所述重链可变区 CDR3 序列选自 SEQ ID NO:3 及其保守修饰;(b) 所述轻链可变区 CDR3 序列选自 SEQ ID NO:6 及其保守修饰。

2. 根据权利要求 1 的分离的抗体,其中所述重链可变区 CDR2 序列选自 SEQ ID NO:2 及其保守修饰,所述轻链可变区 CDR2 序列选自 SEQ ID NO:5 及其保守修饰。

3. 根据权利要求 1 或 2 的分离的抗体,其中所述重链可变区 CDR1 序列选自 SEQ ID NO:1 及其保守修饰,所述轻链可变区 CDR1 序列选自 SEQ ID NO:4 及其保守修饰。

4. 根据权利要求 1 或 2 的分离的抗体,其与人  $\alpha V$  整联蛋白亚基结合的  $K_D$  为  $10^{-8}M$  或更小。

5. 根据权利要求 1 或 2 的分离的抗体,其中所述重链可变区 FR1、FR2、FR3、和 FR4 序列源自重链 CNT0 95 种系序列。

6. 根据权利要求 1 或 2 的分离的抗体,其中所述轻链可变区 FR1、FR2、FR3、和 FR4 序列源自轻链 CNT0 95 种系序列。

7. 一种分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分,包含重链可变区和轻链可变区,其中:(a) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列;(b) 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列;(c) 该抗体与人  $\alpha V$  整联蛋白亚基结合的  $K_D$  为  $10^{-8}M$  或更小。

8. 根据权利要求 7 的分离的人抗体,其中该抗体与人  $\alpha V$  整联蛋白亚基结合的  $K_D$  为  $10^{-9}M$  或更小。

9. 一种分离的人单克隆抗体,包含源自重链 CNT0 95 种系序列的重链可变区和源自轻链 CNT0 95 种系序列的轻链可变区,其中:(a) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列;(b) 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列;(c) 该抗体与人  $\alpha V$  整联蛋白亚基结合的  $K_D$  为  $10^{-8}M$  或更小。

10. 一种分离的人抗  $\alpha V$  亚基的单克隆抗体,所述抗体包含至少一个包含 SEQ ID NO:7 或 8 的可变区。

11. 一种分离的人单克隆抗体,包含分别含有 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 所示氨基酸序列的人重链和人轻链可变区。

12. 权利要求 7-11 之任一项的抗体,其中所述抗体完全抑制 M21 细胞对玻连蛋白的粘附。

13. 权利要求 7-11 之任一项的抗体,其中包含人 IgG 重链和人  $\kappa$  轻链。

14. 权利要求 7-11 之任一项的抗体,其中包含 IgG1 或 IgG3 重链。

15. 一种药物组合物,包含前述权利要求之任一项的人抗体以及可药用载体。

16. 一种组合物,包含至少一种分离的人抗  $\alpha V$  亚基抗体以及至少一种可药用载体或稀释剂,其中所述抗体具有至少一个包含 SEQ ID NO:7 或 8 的可变区。

17. 根据权利要求 15 或 16 的组合物,进一步包含至少一种包含有效量的选自下组的至少一种化合物或蛋白的组合物:至少一种可检测标记或报道分子、抗肿瘤剂、TNF 拮抗剂、抗风湿药物、肌肉松弛剂、麻醉药、非甾体类抗炎药 (NSAID)、镇痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂、抗牛皮癣药物、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、促

红细胞生成素、疫苗、免疫球蛋白、免疫抑制剂、生长激素、激素拮抗剂、生殖激素拮抗剂、激素释放调节剂、激素替代药物、抗抑郁剂、抗精神病药物、刺激剂、抗哮喘药、 $\beta$  激动剂、吸入性类固醇、肾上腺素或类似物、细胞因子或细胞因子拮抗剂。

18. 根据权利要求 17 的组合物,其中该抗体与选自下组的抗肿瘤剂组合:放射性药物、雌激素受体调节剂、类维生素 A、拓扑异构酶抑制剂、细胞毒素、烷化剂、氮芥、亚硝基脲、抗代谢药、有丝分裂抑制剂以及放射致敏剂。

19. 根据权利要求 18 的组合物,其中所述抗肿瘤剂为达卡巴嗪。

20. 一种免疫偶联物,包含与药剂连接的前述权利要求之任一项的抗体。

21. 根据权利要求 20 的免疫偶联物,其中所述药剂为细胞毒素。

22. 根据权利要求 21 的免疫偶联物,其中所述药剂为放射性同位素。

23. 一种药物组合物,包含权利要求 20-22 之任一项的免疫偶联物以及可药用载体。

24. 编码前述权利要求之任一项的人抗体的分离的核酸分子。

25. 根据权利要求 24 的分离的核酸分子,其中所述核酸分子被插入到表达载体中。

26. 一种分离的核酸,编码至少一种分离的人抗  $\alpha$ -V 亚基抗体,所述抗体具有至少一个包含 SEQ ID NO:7 或 8 的可变区。

27. 一种分离的核酸载体,包含权利要求 24 的分离的核酸。

28. 包含权利要求 24 或 26 的分离的核酸的转染瘤。

29. 包含权利要求 24、25、26 或 27 的分离的核酸的原核或真核宿主细胞。

30. 根据权利要求 29 的宿主细胞,其中所述宿主细胞为至少一种选自下组的细胞: COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, 骨髓瘤, 淋巴瘤细胞, Perc. 6 或其任意永生化的细胞。

31. 一种产生至少一种权利要求 1-14 之任一项的抗  $\alpha$ -V 亚基抗体的方法,包括在体外、体内或原位条件下翻译权利要求 24、25、26 或 27 的核酸,从而使得  $\alpha$ -V 亚基抗体以可检测或可回收的量表达。

32. 一种抑制表达  $\alpha$  V 整联蛋白亚基的细胞生长的方法,包括将该细胞与有效量的前述权利要求之任一项的抗体相接触,从而使得该细胞的生长被抑制。

33. 根据权利要求 32 的方法,其中所述有效量为 0.001-50mg/ 千克所述细胞。

34. 权利要求 1-14 之任一项的抗体在制备用于治疗或预防特征在于肿瘤细胞生长或转移的疾病的药物中的用途。

35. 根据权利要求 34 的用途,其中所述疾病是癌症。

36. 根据权利要求 35 的用途,其中所述癌症选自黑素瘤、结肠癌、乳腺癌和肾癌。

37. 根据权利要求 35 的用途,其中所述癌症是恶性黑素瘤。

38. 根据权利要求 35、36 或 37 的用途,其中所述药物与细胞毒性剂联合。

39. 根据权利要求 38 的用途,其中所述细胞毒性剂为达卡巴嗪。

40. 根据权利要求 34 的用途,其中所述人抗体与治疗剂偶联或与该治疗剂一起配制。

41. 根据权利要求 40 的用途,其中所述治疗剂是细胞毒素。

42. 根据权利要求 34-41 之任一项的用途,其中所述药物是选自下组的至少一种制剂: 肠胃外、皮下、肌肉、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、盆腔内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列

腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、快速注射、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内或经皮制剂。

43. 根据权利要求 34-41 之任一项目的用途,其中该药物与包含有效量的选自下组的至少一种化合物或蛋白的组合物联合:至少一种可检测标记或报道分子、抗肿瘤剂、TNF 拮抗剂、抗风湿药物、肌肉松弛剂、麻醉药、非甾体类抗炎药 (NSAID)、镇痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂、抗牛皮癣药物、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、促红细胞生成素、疫苗、免疫球蛋白、免疫抑制剂、生长激素、激素拮抗剂、生殖激素拮抗剂、激素释放调节剂、激素替代药物、抗抑郁剂、抗精神病药物、刺激剂、抗哮喘药、 $\beta$  激动剂、吸入性类固醇、肾上腺素或类似物、细胞因子或细胞因子拮抗剂。

44. 根据权利要求 43 的用途,其中该药物与选自下组的抗肿瘤剂联合:放射性药物、雌激素受体调节剂、类维生素 A、拓扑异构酶抑制剂、细胞毒素、烷化剂、氮芥、亚硝基脲、抗代谢药、有丝分裂抑制剂以及放射致敏剂。

45. 根据权利要求 44 的用途,其中所述抗肿瘤剂是达卡巴嗪。

46. 一种医疗设备,包括至少一种根据权利要求 1-14 之任一项目的分离的人抗  $\alpha$ -V 亚基抗体,其中所述设备适于通过选自下组的至少一种方式接触或给予所述至少一种抗  $\alpha$ -V 亚基抗体:肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、盆腔内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、快速注射、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内或经皮。

47. 一种用于人类制药或诊断用途的制品,包括包装材料和容器,该容器中包含溶液或冻干形式的至少一种根据权利要求 1-14 之任一项目的分离的人抗  $\alpha$ -V 亚基抗体。

48. 根据权利要求 47 的制品,其中所述容器是肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、盆腔内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、快速注射、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内或经皮递送装置或系统的组成部分。

49. 一种产生至少一种根据权利要求 1-14 之任一项目的分离的人抗  $\alpha$  v 整联蛋白亚基抗体的方法,包括用编码所述抗体的核酸分子转染能够以可回收量表达所述抗体的宿主细胞或转基因动物或转基因植物或植物细胞,以及从细胞、动物或植物中回收所述抗体。

50. 由权利要求 49 的方法产生的至少一种抗  $\alpha$ -V 亚基抗体。

51. 至少一种分离的哺乳动物抗  $\alpha$ -V 亚基抗体,其与权利要求 1-14 之任一项目的抗体结合  $\alpha$ -V 亚基蛋白的相同的表位。

52. 根据权利要求 51 的  $\alpha$ -V 亚基抗体,其中所述抗体与  $\alpha$ -V 亚基以选自至少  $10^{-9}$ M、至少  $10^{-10}$ M、至少  $10^{-11}$ M 或至少  $10^{-12}$ M 中的至少一种的亲和力结合。

53. 根据权利要求 51 的  $\alpha$ -V 亚基抗体,其中所述抗体基本上中和至少一种  $\alpha$ -V 亚基蛋白的至少一种活性。

54. 一种分离的核酸,其编码至少一种分离的哺乳动物抗  $\alpha$ -V 亚基抗体,该抗体与权利要求 1-14 之任一项目的抗体结合  $\alpha$ -V 亚基蛋白的相同的表位。

55. 一种分离的核酸,其编码至少一种分离的哺乳动物抗  $\alpha$ -V 亚基抗体,该抗体与权

利要求 1-14 之任一项的抗体结合  $\alpha$ -V 亚基蛋白的相同的表位,其中所述核酸的序列包括 SEQ ID NOs :18 或 19。

56. 一种分离的核酸载体,包含权利要求 54 或 55 的分离的核酸。

57. 包含权利要求 54 或 55 的分离的核酸的原核或真核宿主细胞。

58. 根据权利要求 57 的宿主细胞,其中所述宿主细胞为至少一种选自下组的细胞: COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, 骨髓瘤, 淋巴瘤细胞, 或其任意衍生物、永生化或转化的细胞。

59. 一种特异性结合至少一种权利要求 1-14 之任一项的分离的人抗  $\alpha$ -V 亚基抗体的抗独特型抗体或片段。

60. 一种编码至少一种分离的抗  $\alpha$ -V 亚基抗体的分离的核酸,包含 SEQ ID NO :18 或 19 的核酸序列。

## 抗双整联蛋白抗体、组合物、方法和用途

### [0001] 发明背景

#### 发明领域

[0002] 本申请部分基于并要求 2000 年 8 月 7 日提交的美国临时申请 60/223,363 的优先权,在此引入其全部内容作为参考。

[0003] 本发明涉及至少一种  $\alpha$ -v- $\beta$  3 蛋白、 $\alpha$ -v- $\beta$  5 双整联蛋白(双整联蛋白)或其片段的特异性抗体,包括特定的部分或变体,以及编码所述抗双整联蛋白抗体的核酸、其互补核酸、载体、宿主细胞及其准备方法和用途,包括治疗制剂、给药和设备。

#### 背景技术

[0004] 现在已经有许多证据表明进展性肿瘤生长依赖于血管发生、新血管的形成,它们提供给肿瘤以营养和氧气,带走废物和作为肿瘤向远处转移的导管(Gastl et al., *Oncol.* 54 :177-184)。最近的研究进一步确定了整联蛋白在血管发生过程中的作用。整联蛋白是异二聚的跨膜蛋白,它们在细胞与细胞外基质(ECM)的粘附中起关键作用,这接下来通过细胞内信号传递介导细胞存活、增殖和迁移。在血管发生过程中,许多在活化的内皮细胞表面表达的整联蛋白调节关键的粘附性相互作用,许多 ECM 蛋白调节不同的生物学时间,如细胞迁移、增殖和分化。具体地,已经证明关系最近但又是不同的整联蛋白  $\alpha$ V $\beta$ 3 和  $\alpha$ V $\beta$ 5 介导血管发生过程中的独立途径。针对  $\alpha$ V $\beta$ 3 的抗体阻断碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)诱导的血管发生,而  $\alpha$ V $\beta$ 5 的特异性抗体抑制血管内皮生长因子(VEGF)诱导的血管发生(Eliceiri, et al., *J. Clin. Invest.* 103 :1227-1230(1999);Friedlander et al., *Science* 270 :1500-1502(1995))。

[0005] 非人哺乳动物抗体、嵌合抗体、多克隆抗体(如抗血清)和/或单克隆抗体(Mabs)和抗体片段(如其蛋白水解消化产物或融合蛋白产物)是被研究在某些情况下尝试用于治疗某些疾病的潜在治疗剂。然而,当给予人类这些抗体或片段时可以引发免疫应答。这种免疫应答可以导致免疫复合物介导的从循环中清除抗体或片段,使得重复给药不适用于治疗,从而减少了对患者的治疗益处并且限制了再次给予抗体或片段。例如,重复给予包含非人部分的抗体或片段可以导致血清病和/或过敏。为了避免这些和其它问题,采用了许多方法减少这些抗体及其部分的免疫原性,包括嵌合化和人源化,这是本领域所公知的。然而,这些和其它方法仍然可以产生具有一些免疫原性、低亲和力的抗体和片段,或具有细胞培养、大规模进行、生产和/或低产率的问题。因此,这些抗体或片段对于生产或用作治疗蛋白仍然不够理想。

[0006] 因此,需要提供能够克服这些问题中的一个或多个的抗双整联蛋白抗体或片段,以及改进已知的抗体或其片段。

### [0007] 发明概述

[0008] 本发明提供如这里所描述和实现的分离的人、灵长类、啮齿类、哺乳动物、嵌合、人源化和/或 CDR 嫁接的抗双整联蛋白抗体、免疫球蛋白、其裂解产物及特定的部分和变体,

以及抗双整联蛋白抗体组合物、其编码或互补核酸、载体、宿主细胞、组合物、制剂、设备、转基因动物、转基因植物及其制备方法和用途,它们结合了本领域已知的成分。

[0009] 本发明也提供了至少一种这里所描述的抗双整联蛋白抗体。本发明的抗体包括任何包含含有免疫球蛋白分子的至少一部分的分子的蛋白或肽,所述部分可以是,但不限于可以掺入本发明的抗体的至少一种重链或轻链或其配体结合部分的互补决定区(CDR)、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、构架区、或其任意部分。本发明的抗体可以包括或来源于任何哺乳动物,例如,但不限于人、小鼠、兔、大鼠、啮齿类动物、灵长类动物或其任意组合等。

[0010] 本发明的一方面提供一种分离的核酸分子,它包含、互补于或杂交于一种编码特异性抗双整联蛋白抗体的多核苷酸,该抗体包含至少一种其特定序列、结构域、部分或变体。本发明进一步提供了包含所述抗双整联蛋白抗体核酸分子的重组载体,含所述核酸和/或重组载体的宿主细胞,以及这种抗体核酸、载体和/或宿主细胞的制备方法和/或用途。

[0011] 本发明的至少一种抗体结合至少一种特异于至少一种双整联蛋白、其亚基、片段、部分或其任意组合的特定表位。所述至少一种表位可以包含至少一种抗体结合区,它包含所述蛋白的至少一部分,该表位优选由其至少一部分的至少 1-5 个氨基酸组成,所述至少一部分例如,但不限于, SEQ ID NO :9, 16, 和 17 的 (a) 29-48, 58-63, 69-79, 82-85, 88-134, 140-157, 161-183, 186-190, 192-198, 202-212, 215-217, 223-237, 240-244, 248-255, 259-268, 287-301, 313-322, 326-328, 332-344, 348-351, 354-365, 376-387, 393-401, 407-414, 417-419, 422-433, 443-451, 458-461, 465-469, 472, (b) 32-41, 46-47, 53-55, 58-69, 72-74, 77-79, 85-88, 91-94, 96-105, 110-113, 117-125, 129-142, 145-153, 155-159, 161-163, 166-170, 172-174, 184-197, 200-209, 215-218, 221-225, 184-197, 200-209, 215-218, 221-225, 227-250, 259-261, 263-267, 269-270, 275-281; 和 (c) 29-35, 43-45, 48-63, 67-69, 72-74, 80-82, 84-87, 95-105, 108-113, 117-142, 145-163, 166-170, 172-176, 184-186, 191-201, 204-206, 216-219, 224-226, 229-251, 260-262, 264-268, 276-282, 286-288, 294-299, 301-318, 323-325, 328-330, 338-342, 345-349, 353-358, 或例如,但不限于所述双整联蛋白的至少一个功能性、细胞外、可溶的、亲水的、外部或细胞质结构域、亚基或其任意部分。

[0012] 所述至少一种抗体可以任选包含至少一种互补决定区(CDR)(如重链或轻链可变区的 CDR1, CDR2 或 CDR3) 和/或至少一种恒定或可变构架区或其任意部分的至少一种特定部分。所述至少一种抗体的氨基酸序列可以进一步任选包含这里描述的或本领域公知的至少一种特定的取代、插入或删除。

[0013] 本发明也提供了这里所描述的至少一种分离的抗双整联蛋白抗体,其中该抗体具有至少一种活性,例如,但不限于抑制玻连蛋白结合、抑制  $\alpha$ -v $\beta$ -3 与至少一种  $\alpha$ -v $\beta$ -3 配体或受体的结合,抑制  $\alpha$ -v $\beta$ -5 与至少一种  $\alpha$ -v $\beta$ -5 配体或受体的结合,血管生成调节、与表达双整联蛋白或单整联蛋白的细胞结合。因此可以根据已知方法筛选一种抗双整联蛋白抗体的相应活性,例如,但不限于对双整联蛋白的至少一种生物活性。

[0014] 本发明进一步提供了本发明的至少一种双整联蛋白抗体的至少一种双整联蛋白抗独特型抗体。该抗独特型抗体包括任何含有包含免疫球蛋白分子的至少一部分的分子的蛋白或肽,所述部分可以是,但不限于可以掺入本发明的抗体的至少一种重链或轻链或其

配体结合部分的互补决定区 (CDR)、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、构架区、或其任意部分。本发明的抗体可以包括或来源于任何哺乳动物,例如,但不限于人、小鼠、兔、大鼠、啮齿类动物、灵长类动物或其任意组合等。

[0015] 本发明的一方面提供一种分离的核酸分子,它包含、互补于或杂交于一种编码至少一种双整联蛋白抗独特型抗体的多核苷酸,该抗体包含至少一种其特定序列、结构域、部分或变体。本发明进一步提供了包含所述双整联蛋白抗独特型抗体的编码核酸分子的重组载体,含所述核酸和 / 或重组载体的宿主细胞,以及这种抗独特型抗体核酸、载体和 / 或宿主细胞的制备方法和 / 或用途。

[0016] 本发明也提供了至少一种在宿主细胞中表达至少一种抗双整联蛋白抗体、或双整联蛋白抗独特型抗体的方法,包括按照此处的描述在其中至少一种抗双整联蛋白抗体以可检测和 / 或可回收的量表达的条件下培养宿主细胞。

[0017] 本发明也提供了至少一种组合物,它包含 (a) 如此处描述的分离的抗双整联蛋白抗体的编码核酸和 / 或抗体;和 (b) 合适的载体或稀释剂。载体或稀释剂可以任选是可药用的已知载体或稀释剂。该组合物可以任选进一步包含至少一种其它的化合物、蛋白或组合物。

[0018] 本发明进一步提供了至少一种抗双整联蛋白抗体方法或组合物,用于在本领域已知的和 / 或这里所描述的相关状况之前、之后或之时以治疗有效量给药,以便调节或治疗细胞、组织、器官、动物或病人中的至少一种双整联蛋白相关状况。

[0019] 本发明也提供了至少一种递送治疗或预防有效量的至少一种本发明的抗双整联蛋白抗体的组合物、设备和 / 或方法。

[0020] 本发明进一步提供了至少一种抗双整联蛋白抗体方法或组合物,用于在本领域已知的和 / 或这里所描述的相关状况之前、之后或之时诊断细胞、组织、器官、动物或病人中的至少一种双整联蛋白相关状况。

[0021] 本发明也提供了至少一种递送用于诊断至少一种本发明的抗双整联蛋白抗体的组合物、设备和 / 或方法。

## 附图说明

[0022] 图 1 表示 RT 下抗  $\alpha V\beta 3$  Mab 的双倍稀释液在  $\alpha V\beta 3$  包被的板上孵育 1 小时。洗涤板两次,用 HRP 标记的山羊抗人 IgG  $\kappa$  特异性抗体在 RT 下探测 1 小时。再次洗涤板,用 OPD 底物显影,并且在 490nm 测量 OD 值。

[0023] 图 2 表示在 P1F6 存在或不存在的条件下,用抗体样品,抗  $\alpha V\beta 5$  腹水预孵育 calcein 标记的 M21 细胞 30 分钟。用含钙的 HBSS 以 150  $\mu$  L/ 孔洗涤两次,以去除未结合的 M21 细胞。在荧光计中以 485-538nm 对板进行读数。

[0024] 图 3 表示细胞粘附,收获并用各种浓度的 Gen095 预孵育 MDAMB435L2 细胞 10 分钟。然后将肿瘤细胞加入玻连蛋白包被的 Linbro 板,并且在 37°C 下孵育 1 小时。洗涤各个孔三次,向每个孔中加入基于 MTT 的 CellTiter AQ 染料。在 ELISA 板读数器下测定细胞粘附,其中 OD490nm 与细胞粘附成正比。与 BSA 包被的孔的细胞粘附作为阴性对照 (数据未示出)。每个数据点是三次测定的平均值。

[0025] 图 4A-D 表示抗体与  $\alpha V\beta 3$  的结合,其中该配体在双倍稀释液中在 37°C 下预孵育



30 分钟,该稀释液是用含 50mM EDTA 的 1% BSA-HBSS(无 Ca<sup>++</sup>) 或 1% BSA-HBSS(有 Ca<sup>++</sup>) 稀释得到的,从 10 μg/mL 开始。向 CNT095, C372, c7E3 或 LM609 IgG 包被的板中加入混合物并且在 37°C 下孵育 1 小时。在 37°C 下 30 分钟加入浓度为 20 μg/mL 的适当缓冲液中 (+/-Ca<sup>++</sup>) 的 LM609 或 CNT0 95。用山羊抗小鼠 IgG Fc, HRP 或山羊抗人 IgG Fc, HRP 探测板。

[0026] 图 4E-G 表示抗体与 αVβ5 的结合,其中该配体在双倍稀释液中在 37°C 下预孵育 30 分钟,该稀释液是用含 50mMEDTA 的 1% BSA-HBSS(无 Ca<sup>++</sup>) 或 1% BSA-HBSS(有 Ca<sup>++</sup>) 稀释得到的,从 10 μg/mL 开始。向 CNT095, C372, c7E3 IgG 包被的板中加入混合物并且在 37°C 下孵育 1 小时。在 37°C 下 30 分钟加入浓度为 10 μg/mL 的溶于适当缓冲液中 (+/-Ca<sup>++</sup>) 的 LM609 或 VNR139。用山羊抗小鼠 IgG Fc, HRP 探测板。

[0027] 图 5A-B 表示 Gen0.95(图 5A) 和 ReoPro(图 5B) 包被的板的饱和结合曲线。

[0028] (国际公开时缺页)

[0029] 免疫荧光和通过流式细胞术分析。左边的图代表同种型匹配的抗体存在下的本底荧光。右边的图代表阳性染色。A, D, G, LM609(针对 αVβ3 的 mAb, 10 μg/ml); B, E, H, P1F6(针对 αVβ5 的 mAb, 10 μg/ml); 以及 C, F, I, (10 μg/ml)。

[0030] 图 13. HUVECS 与基质蛋白包被的板的粘附。粘附测定按实施例 5 中描述的方法进行。在荧光计上在 485-538nm 下对板进行读数。与 BSA 包被的孔的细胞粘附作为阴性对照。在图 13 中,用各种浓度抗体存在下的细胞粘附程度作图,表示为细胞粘附百分比,无抗体时的细胞粘附作为 100%。每个数据点是三次测定的平均值 (+/-SD)。

[0031] 图 14. 人黑色素瘤细胞与基质蛋白包被的板的粘附。粘附测定按方法部分的描述进行。与 BSA 包被的孔的细胞粘附作为阴性对照。在图 14 中,用各种浓度抗体存在下的细胞粘附程度作图,表示为细胞粘附百分比,无抗体时的细胞粘附作为 100%。每个数据点是三次测定的平均值 (+/-SD)。

[0032] 图 15. 人结肠癌 HT29 细胞与玻连蛋白的粘附。粘附测定按方法部分的描述进行。与 BSA 包被的孔的细胞粘附作为阴性对照。图 15 的数据作图为最大结合百分比(无抗体),每个数据点是三次测定的平均值 (+/-SD)。

[0033] 图 16A-D. HUVECS 向 2 μg/ml 玻连蛋白的迁移。该测定按方法部分的描述进行,允许细胞迁移 6 小时。显微照片是细胞迁移的代表性视野(10 倍物镜)。在图 16A 中,无抗体, (16B), Gen095(5 μg/ml), (16C), Gen095(40 μg/ml)。图 16D 是在各种浓度的 Gen095 存在下的细胞迁移图。数据标准化为对照(无抗体)的百分比,对照作为 100%,每个数据点是三个经孔滤膜的平均值 (+/-SD)。

[0034] 图 17. αVβ3 和 αVβ5 存在下 HUVECS 向 2 μg/ml 玻连蛋白的迁移。该迁移测定按方法部分的描述进行,允许细胞迁移 6 小时。LM609 和 P1F6 分别是针对 αVβ3 和 αVβ5 的单克隆抗体。图 17 的数据标准化为对照(无抗体)的百分比,对照作为 100%,每个柱是三个经孔滤膜的平均值 (+/-SD)。BSA、小鼠 IgG 和人 IgG 作为阴性对照。LM609-P1F6 代表两种抗体的组合。抗体和 BSA 在 10 μg/ml 的浓度下使用。

[0035] 图 18A-E. HUVECS 向 2% FBS 的迁移。迁移测定进行 4 小时,按方法部分的描述采集数据。图 18(A) 是 LM609, P1F6, LM609+P1F6 的组合、同种型匹配的对照抗体(人和小鼠)存在下细胞迁移的图示。抗体和蛋白在 10 μg/ml 的浓度下使用。图 18(B) 是 ReoPro

和 Gen095 存在下的细胞迁移的示意图。显微照片是细胞迁移的代表性视野 (10 倍物镜)。图 18(C), 无抗体, 图 18(D), Gen095 (5  $\mu$  g/ml), 以及图 18(E), Gen095 (20  $\mu$  g/ml)。数据标准化为对照 (无抗体) 的百分比, 对照作为 100%, 每个数据点是三个经孔滤膜的平均值 (+/-SD)。

[0036] 图 19A-E. A375S. 2 细胞向 10% FBS 的迁移。迁移测定进行 4 小时, 按方法部分的描述采集数据。抗体在 10  $\mu$  g/ml 的浓度下使用。图 19(A) 是在各种浓度 Gen095 存在下的细胞迁移。图 19(B) 是 LM609, P1F6, LM609+P1F6 的组合、同种型匹配的对照抗体 (人和小鼠) 存在下细胞迁移的图示。数据标准化为对照 (无抗体) 的百分比, 对照作为 100%, 每个数据点是三个经孔滤膜的平均值 (+/-SD)。显微照片是细胞迁移的代表性视野 (10 倍物镜)。图 19(C), 无抗体, 图 19(D), Gen095 (5  $\mu$  g/ml), 以及图 19(E), Gen095 (20  $\mu$  g/ml)。

[0037] 图 20A-E. bFGF 存在下 HUVECS 向玻连蛋白的迁移。迁移室滤膜的内面用 2  $\mu$  g/ml 玻连蛋白包被, 按方法部分的描述进行测定。允许细胞迁移 6 小时。在图 20A-E 中, 每个数据点是三个经孔滤膜的平均值 (+/-SD)。图 20(A), bFGF; 图 20(B), Gen095 (5  $\mu$  g/ml); 图 20(C), Gen095 (40  $\mu$  g/ml); 图 20(D), 无 bFGF。图 20(E), 图示了各种抗体存在下细胞迁移的抑制。

[0038] 图 21A-D. A375S. 2 细胞通过纤维蛋白凝胶 (5mg/ml) 的侵入。允许侵入测定进行 24 小时, 按方法部分的描述采集数据。显微照片是细胞侵入的代表性视野 (4 倍物镜)。图 21(A), 无抗体, 图 21(B), Gen095 (10  $\mu$  g/ml), 图 21(C) 和 (D) 是 Gen095, 10E5F(ab')<sub>2</sub>, LM609, P1F6, LM-PIF6 (LM609+P1F6), 人和小鼠 IgG (H-IgG 和 M-IgG) 存在下细胞侵入的图示。图 21(D): 所有抗体和蛋白的浓度是 10  $\mu$  g/ml。数据标准化为对照 (无抗体) 的百分比, 对照作为 100%, 每个数据点是三个经孔滤膜的平均值 (+/-SD)。

[0039] 发明详述

[0040] 本发明提供分离的、重组的和 / 或合成的人、灵长类、啮齿类、哺乳动物、嵌合、人源化和 / 或 CDR 嫁接的抗双整联蛋白抗体和双整联蛋白抗独特型抗体, 以及包含至少一种编码至少一种抗双整联蛋白抗体或双整联蛋白抗独特型抗体的多核苷酸的组合物和编码核酸分子。本发明进一步包括, 但不限于, 所述核酸和抗体以及抗独特型抗体的制备方法和用途, 包括诊断和治疗组合物、方法和设备。

[0041] 这里用到的“抗  $\alpha v \beta 3$ ,  $\alpha v \beta 5$  双整联蛋白抗体”、“抗双整联蛋白抗体”、“抗双整联蛋白抗体部分”或“抗双整联蛋白抗体片段”和 / 或“抗双整联蛋白抗体变体”等包括任何含有一种分子的肽或多肽, 该分子包含免疫球蛋白分子的至少一部分, 例如, 但不限于重链或轻链的互补决定区 (CDR) 或其配体结合部分、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、构架区或其任意部分, 或可以掺入到本发明的抗体中的双整联蛋白受体或结合蛋白的至少一部分。这种抗体任选进一步影响特异性配体, 例如, 但不限于, 这些抗体调节、减少、增加、拮抗、激动、减轻、缓解、阻断、抑制、消除和 / 或干扰至少一种双整联蛋白活性或结合, 或在体外、原位和 / 或体外具有双整联蛋白受体活性或结合。作为非限制性的例子, 本发明的适当抗双整联蛋白抗体、特定部分或变体可以结合至少一种双整联蛋白、或其特定部分、变体或结构域。适当的抗双整联蛋白抗体、特定部分或变体也可以任选影响至少一种双整联蛋白活性或功能, 例如, 但不限于, RNA、DNA 或蛋白合成, 双整联蛋白释放, 双整联蛋白受体信号传递、膜双整联蛋白裂解、双整联蛋白活性、双整联蛋白产生和 / 或合成。术语“抗体”进一

步包含抗体、其消化片段、特定部分和变体,包括抗体模拟物或包括模拟抗体或其特定片段或部分的结构和 / 或功能的抗体部分,包括单链抗体及其片段。功能性片段包括与哺乳动物双整联蛋白结合的抗原结合片段。例如,本发明也包括能够与双整联蛋白或其部分结合的抗体片段,包括但不限于 Fab(例如通过木瓜蛋白酶消化),Fab' (如通过胃蛋白酶消化和部分还原)和F(ab')<sub>2</sub>(如通过胃蛋白酶消化),facb(如通过纤溶酶消化),pFc' (如通过胃蛋白酶或纤溶酶消化),Fd(如通过胃蛋白酶消化、部分还原和再聚集),Fv 或 scFv(如通过分子生物学技术)片段(见例如,Colligan, Immunology, 同上)。

[0042] 这些片段可以通过如本领域公知的和 / 或这里描述酶促裂解、合成或重组技术而产生。也可以用抗体基因产生各种截短形式的抗体,在这些基因中天然终止位点的上游导入了一个或多个终止密码子。例如可以设计一种编码 F(ab')<sub>2</sub> 重链部分的组合基因,使其包含编码重链 CH<sub>1</sub> 结构域和 / 或铰链区的 DNA 序列。可以通过常规技术将抗体的各部分以化学方式连接在一起,或用基因工程技术制备作为连续蛋白的抗体的各部分。

[0043] 这里用到的术语“人抗体”是指这样一种抗体,其中该蛋白的每个部分(如 CDR, 构架区, CL, CH 结构域(如 CH1, CH2, CH3), 铰链区, (VL, VH)) 在人类中基本是非免疫原性的, 仅仅有微小的序列改变或变异。同样,称作灵长类(猴、狒狒、猩猩等)、啮齿类(小鼠、大鼠、兔、豚鼠、仓鼠等)和其它哺乳动物抗体的抗体是指这种物种、亚属、属、亚家族、家族特异性抗体。此外,嵌合抗体包括上述抗体的任意组合。这种改变或变异相对于未修饰抗体任选并优选保留或减少人类在人或其它物种中的免疫原性。因此,人抗体与嵌合或人源化抗体不同。已经指出,人抗体可以由能够表达功能性重排的人免疫球蛋白(如重链和 / 或轻链)基因的非人动物或原核或真核细胞产生。此外,当人抗体是单链抗体时,它可以包含在天然人抗体中不存在的连接肽。例如, Fv 可以包含连接肽,例如大约 2-8 个甘氨酸或其它氨基酸残基,它们连接重链可变区和轻链可变区。这种连接肽被认为是来源于人的。

[0044] 也可以使用双特异性、异特异性、异偶联或类似的抗体,它们是对至少两个不同抗原具有结合特异性的抗体。在本申请中,一种结合特异性是针对至少一种双整联蛋白,另一种是针对任意其它抗原。制备特异性抗体的方法是本领域中公知的。一般地,双特异性抗体的重组产生是基于两个免疫球蛋白重链 - 轻链对的共表达,其中两个重链具有不同的特异性(Milstein and Cuello, Nature 305 :537(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤产生 10 中不同抗体分子的可能混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行的正确分子的纯化是繁杂的,产率很低。相似的程序公开于,例如 WO 93/08829, US Patent Nos, 6210668, 6193967, 6132992, 6106833, 6060285, 6037453, 6010902, 5989530, 5959084, 5959083, 5932448, 5833985, 5821333, 5807706, 5643759, 5601819, 5582996, 5496549, 4676980, WO 91/00360, WO 92/00373, EP 03089, Trauneker et al., EMBOL. 10 :3655(1991), Suresh et al., Methods in Enzymology 121 : 210(1986), 在此引入其完整内容作为参考。

[0045] 用于本发明的方法和组合物中的抗双整联蛋白抗体(也称作双整联蛋白抗体)的特征可以任选在于与双整联蛋白结合的高亲和性,并且任选并优选具有低毒性。具体地,本发明中使用其中各个成分,如可变区、恒定区和构架区的和 / 或其集合任选和优选具有低免疫原性的本发明的抗体、特定片段或变体。本发明中使用的抗体的特征任选在于它们能够在很长时间内治疗患者,具有可测量的症状缓解和 / 或可接受的毒性。低或可接受的免

疫原性和 / 或高亲和性, 以及其它适当的特性可以用于达到治疗结果。此处定义的“低免疫原性”是指在约 75% 以下或优选 50% 的受治疗患者中引起显著的 HAHA, HACA 或 HAMA 反应, 和 / 或在受治疗患者中产生低滴度 (用双抗原酶免疫测定时小于约 300, 优选小于约 100) (Elliott et al., Lancet 344 :1125-1127 (1994), 在此引入其完整内容作为参考)。

#### [0046] 用途

[0047] 本发明的分离核酸可以用于产生至少一种抗双整联蛋白抗体或其特定变体, 所述抗体或其特定变体可以用于在细胞、组织、器官或动物 (包括哺乳动物和人) 中测量或起作用, 用于诊断、监测、调节、治疗、缓解至少一种双整联蛋白状况, 帮助预防该状况的发生, 或减轻其症状, 所述状况选自, 但不限于, 至少一种免疫紊乱或疾病、一种心血管紊乱或疾病、感染性、恶性和 / 或神经紊乱或疾病, 或其它已知或特定的双整联蛋白相关状况。

[0048] 这种方法包括将有效量的含有至少一种抗双整联蛋白抗体的组合物或药物组合物给予需要这种调节、治疗、缓解、预防或减轻该症状、作用或机制的细胞、组织、器官、动物或患者。有效量可以包括每单次 (如快速注射 (bolus))、多次或连续给药时约 0.001-500mg/kg, 或每单次 (如团快速注射)、多次或连续给药时达到约 0.01-5000  $\mu$ g/ml 的血清浓度, 或用此处描述的或相关领域中已知的方法完成和测定的任意有效范围或值。

#### [0049] 引用文献

[0050] 在此引入这里所引用的所有出版物或专利的完整内容作为参考, 它们显示了本发明时的技术状态和 / 或为本发明提供了说明并使本发明成为可能。出版物是指任何科学或专利公开, 或可以用任何媒体形式, 包括所有录音、电子或印刷形式获得的任何其它信息, 在此全文引入以下对比文献作为参考: Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001)。

#### [0051] 本发明的抗体

[0052] 本发明的抗双整联蛋白抗体可以任选通过本领域公知的细胞系、混合细胞系、永生化细胞或永生化细胞的克隆群产生。见, 例如, Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), 在此全文引入作为参考。

[0053] 可以通过用适当的免疫原性抗原, 如分离的和 / 或双整联蛋白或其部分 (包括合成分子, 如合成肽) 诱导产生人双整联蛋白或其片段的特异性人抗体。可以用相似的方法产生其它特异性或普通哺乳动物抗体。可以用适当的技术制备免疫原性抗原和产生单克隆抗体。

[0054] 在一种方法中,可以通过融合适当的永生细胞系和抗体产生细胞而产生。所述细胞系如骨髓瘤细胞系,例如,但不限于 Sp2/0, Sp2/0-AG14, NS0, NS1, NS2, AE-1, L. 5, > 243, P3X63Ag8. 653, Sp2SA3, Sp2MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A 等,或异骨髓瘤,或本领域已知的其它细胞系。见,例如, [www.atcc.org](http://www.atcc.org), [www.lifetech.com](http://www.lifetech.com) 等。所述抗体产生细胞例如,但不限于分离的或克隆的脾细胞、外周血细胞、淋巴细胞、扁桃体或其它免疫细胞或 B 细胞,或其它任何表达重链或轻链恒定区或可变区或构架区或 CDR 序列的细胞,这些序列可以是内源性或异源核酸,重组或内源性的、病毒、细菌、藻类、原核生物、两栖动物、昆虫、爬行动物、鱼类、哺乳动物、啮齿类、马、山羊、绵羊、灵长类、真核生物的基因组 DNA, cDNA, rDNA, 线粒体 DNA 或 RNA, 叶绿体 DNA 或 RNA, hnRNA, mRNA, tRNA, 单链、双链或三链、杂交序列等或其组合。见,例如 Ausubel, 同上, 和 Colligan, Immunology, 同上, 第二章, 在此引入作为参考。

[0055] 抗体产生细胞也可以从用感兴趣的抗原免疫的人或其它适当动物的外周血或优选脾或淋巴结获得。也可以用任何其它适当的宿主细胞表达编码本发明的抗体、其特定片段或变体的异源或内源性核酸。可以用选择性培养条件或其它适当的已知方法分离融合细胞(杂交瘤)或重组细胞,并且用有限稀释或细胞分拣或其它公知方法进行克隆。产生具有所需特异性的抗体的细胞可以通过适当的测定(如 ELISA)进行选择。

[0056] 可以使用其它适当的产生或分离具有所需特异性的抗体,包括,但不限于本领域公知和/或此处描述的从能够产生人抗体所有组成成分的肽或蛋白文库(所述文库例如,但不限于噬菌体、核糖体、寡核苷酸、RNA、cDNA 等、展示文库;如可以来自于 Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, UK; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, DE; Biovation, Aberdeen, Scotland, UK; BioInvent, Lund, Sweden; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, CA; Ixsys, 见,例如 EP 368,684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260 (5/12/94); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); W090/14443; W090/14424; W090/14430; PCT/US94/1234; W092/18619; W096/07754; (Scripps); EP614989 (MorphoSys); W095/16027 (BioInvent); W088/06630; W090/3809 (Dyax); US4,704,692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Affymax); W089/06283; EP371998; EP550400; (Xoma); EP229046; PCT/US91/07149 (Ixsys)); 或随机产生的肽或蛋白-US 5723323, 5763192, 5814476, 5817483, 5824514, 5976862, WO 86/05803, EP 590689 (Ixsys, 目前应用的分子演变 (AME), 在此全文引入作为参考); 或依赖于转基因动物免疫的肽或蛋白(所述转基因动物如 SCID 小鼠, Nguyen et al., Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997); Sandhu et al., Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118 (1996); Eren et al., Immunol. 93:154-161 (1998), 每个文献或相关专利和申请均在此引入作为参考)选择重组抗体的方法。这些技术包括但不限于,核糖体展示 (Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942 (May 1997); Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135 (Nov. 1998)); 单细胞抗体产生技术(如选择的淋巴细胞抗体方法("SLAM"))(美国专利 5,627,052, Wen et al., J. Immunol. 17:887-892 (1987); Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996)); 凝胶微滴和流式细胞术 (Powell et

al., *Biotechnol.* 8:333-337(1990); *One Cell Systems*, Cambridge, MA; Gray et al., *J. Imm. Meth.* 182:155-163(1995); Kenny et al., *Bio/Technol.* 13:787-790(1995); B 细胞选择 (Steenbakkers et al., *Molec. Biol. Reports* 19:125-134(1994); Jonak et al., *Progress Biotech*, Vol. 5, *In Vitro Immunization in Hybridoma Technology*, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, Netherlands(1988))。

[0057] 也可以使用本领域公知的工程化或人源化非人或人抗体的得到。一般地,人源化或工程化的抗体具有一个或多个非人来源的氨基酸,例如,但不限于来源于小鼠、大鼠、非人灵长类或其它哺乳动物。这些人类氨

[0058] 基酸残基一般称作“输入”残基。一般来自于已知人序列的“输入”可变区、恒定区或其它结构域。已知的人 IgG 序列公开于,例如

[0059] [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi); [www.atcc.org/phage/hdb.html](http://www.atcc.org/phage/hdb.html); [www.sciquest.com/](http://www.sciquest.com/);

[0060] [www.abcam.com/](http://www.abcam.com/); [www.antibodyresource.com/onlinecomp.html](http://www.antibodyresource.com/onlinecomp.html);

[0061] [www.public.iastate.edu/~pedro/research\\_tools.html](http://www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html); [www.mgen.uni-](http://www.mgen.uni-)

[0062] [heidelberg.de/SD/IT/IT.html](http://heidelberg.de/SD/IT/IT.html); [www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm](http://www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm);

[0063] [www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html](http://www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html);

[0064] [www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/](http://www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/); [www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html](http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html);

[0065] [www.antibodyresource.com/](http://www.antibodyresource.com/);

[0066] [mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html](http://mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html). [www.immunologylink.com/](http://www.immunologylink.com/);

[0067] [pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html](http://pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html); [www.biotech.ufl.edu/~hcl/](http://www.biotech.ufl.edu/~hcl/);

[0068] [www.pebio.com/pa/340913/340913.html](http://www.pebio.com/pa/340913/340913.html); [www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/](http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/);

[0069] [www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html](http://www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html); [www.biodesign.com/table.asp](http://www.biodesign.com/table.asp);

[0070] [www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html](http://www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html); [www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html](http://www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html); [\[0071\] \[net.org/sites\\\_geo.html\]\(http://net.org/sites\_geo.html\); \[aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html\]\(http://aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html\);](http://www.isac-</a></p></div><div data-bbox=)

[0072] [baserv.uci.kun.nl/~jraats/linksl.html](http://baserv.uci.kun.nl/~jraats/linksl.html); [www.recab.uni-hd.de/immunobme.nwu.edu/](http://www.recab.uni-hd.de/immunobme.nwu.edu/);

[0073] [www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html); [www.ibt.unam.mx/vir/V\\_mice.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html);

[0074] [imgt.cnusc.fr:8104/](http://imgt.cnusc.fr:8104/); [www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html](http://www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html); [antibody.bath.ac.uk/](http://antibody.bath.ac.uk/);

[0075] [abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html](http://abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html);

[0076] [www.unizh.ch/~honegger/AH0seminar/Slide01.html](http://www.unizh.ch/~honegger/AH0seminar/Slide01.html); [www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/](http://www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/);

- [0077] [www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm](http://www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm) ;
- [0078] [www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html](http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html) ;
- [0079] [www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat\\_aim.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html) ;[www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html](http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html) ;
- [0080] [www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html](http://www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html) ;
- [0081] [www.jerini.de/fr\\_products.htm](http://www.jerini.de/fr_products.htm) ;[www.patents.ibm.com/ibm.html](http://www.patents.ibm.com/ibm.html). Kabat et al. , Sequences of
- [0082] Proteins of Immunological Interest, U. S. Dept. Health(1983),
- [0083] 在此全文引入作为参考。
- [0084] 这些输入序列可以用于减少免疫原性,或用于减少、增强或修饰结合、亲和性、开率 (on-rate)、闭率 (off-rate)、亲和力、特异性、半衰期或任意其它适当的特征,如本领域所公知的。保留非人或人 CDR 序列的大部分或全部,用人氨基酸或其它氨基取代可变区和恒定区。任选对抗体人源化,保留抗体对抗原的高亲和性和其它有利的生物学特性。为了达到这一目的,通过采用母体和人源化序列的三维模型分析母体序列和各种得到的人源化序列的过程任选制备人源化抗体。通常可以得到三维免疫球蛋白模型,并且是本领域技术人员公知的。说明和演示所选的候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构计算机程序是可得到的。检查这些演示结果可以分析候选免疫球蛋白序列功能中残基的可能作用,即,分析影响候选免疫球蛋白与其抗原的结合能力的残基。以这种方式,可以选择 FR 残基,并且与共有序列和输入序列结合,从而得到需要的抗体特征,如对靶抗原的亲和性增加。概言之,CDR 残基直接并最大程度参与抗原结合的影响。本发明抗体的人源化或工程化可以采用任意已知的方法进行,例如,但不限于,以下文献中描述的方法, Winter (Jones et al. , Nature 321 :522(1986) ; Riechmann et al. Nature 332 :323(1988) ; Verhoeyen et al. , Science 239 :1534(1988)), Sims et al. , J. Immunol. 151 :2296(1993) ; Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196 :901(1987), Carter et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89 :4285(1992) ; Presta et al. , J. Immunol. 151 :2623(1993), 美国专利 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5, 766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539 ; 4816567, PCT/ :US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755 ; W090/14443, W090/14424, W090/14430, EP 229246, 在此全文引入每一篇文献作为参考。
- [0085] 抗双整联蛋白抗体也可以任选通过免疫能够产生人类抗体所有组成成分的转基因动物 (如小鼠、大鼠、仓鼠、非人灵长类等) 而产生,如此处的描述和 / 或本领域所公知。产生人类抗双整联蛋白抗体的细胞可以通过适当的方法从这些动物中分离并永生,例如通过这里所描述的方法。
- [0086] 可以产生与人抗原结合的人类抗体所有组成成分的转基因动物是通过公知方法产生的 (例如,但不限于授权于 Lonberg 等的美国专利 5,770,428, 5,569,825, 5,545,806, 5,625,126, 5,625,825, 5,633,425, 5,661,016 和 5,789,650, Jakobovits 等的 WO 98/50433, Jakobovits 等的 WO 98/24893, Lonberg 等的 WO 98/24884, Lonberg 等的 WO 97/13852, Lonberg 等的 WO 94/25585, Kucherlapate 等的 WO 96/34096, Kucherlapate 等的 EP 0463151B1, Kucherlapate 等的 EP 0710719A1, Surani 等的美国专利 5,545,807,

Bruggemann 等的 WO 90/04036, Bruggemann 等的 EP 0438474B1, Lonberg 等的 EP 0814259A2, Lonberg 等的 GB 2272440A, Lonberg et al. *Nature* 368 :856-859(1994), Taylor et al., *Int. Immunol.* 6(4)579-591(1994), Green et al, *Nature Genetics* 7 :13-21(1994), Mendez et al., *Nature Genetics* 15 :146-156(1997), Taylor et al., *Nucleic Acids Research* 20(23) :6287-6295(1992), Tuailon et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 90(8)3720-3724(1993), Lonberg et al., *Int Rev Immunol* 13(1) :65-93(1995) 和 Fishwald et al., *Nat Biotechnol* 14(7) :845-851(1996), 在此全文引入每一篇文献作为参考。一般地, 这些小鼠包含至少一种转基因, 所述转基因包含来自于至少一种人免疫球蛋白基因座的 DNA, 它进行了功能性重排, 或可以进行功能性重排。该小鼠中的内源性免疫球蛋白基因座可以被破坏或去除, 以便去除动物产生由内源性基因编码的抗体的能力。

[0087] 可以通过肽展示文库方便地完成筛选特异性与相似蛋白或片段结合的抗体。该方法包括筛选大量肽中具有所需功能或结构的各个成员。肽展示文库的抗体筛选是本领域公知的。展示的肽序列长度可以为 3-5000 或更多氨基酸, 通常长度为 5-100 个氨基酸。除了产生肽文库的直接化学合成方法, 也描述了一些重组 DNA 法。一种类型包括在噬菌体或细胞的表面展示肽序列。每种噬菌体或细胞含有具体展示的肽序列的编码核苷酸序列。这些方法描述于 PCT 专利公开 91/17271, 91/18980, 91/19818 和 93/08278。用于产生肽文库的其它系统同时具有体外化学合成和重组方法。见 PCT 专利公开 92/05258, 92/14843 和 96/19256。也见美国专利 5, 658, 754 和 5, 643, 768。肽展示文库、载体和筛选试剂盒可以从 Invitrogen (Carlsbad, CA) 和 Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire, UK) 等供应商购得。见, 例如 Enzon 的美国专利 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456 ; Dyax 的美国专利 5223409, 5403484, 5571698, 5837500 ; Affymax 的美国专利 5427908, 5580717 ; Cambridge antibody Technologies 的美国专利 5885793 ; Genentech 的美国专利 5750373 ; Xoma 的美国专利 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493, 5698417 ; Colligan, 同上 ; Ausubel, 同上 ; Sambrook, 同上, 在此全文引入上述每个专利和出版物作为参考。

[0088] 也可以使用至少一种编码抗双整联蛋白抗体的核酸提供转基因动物或哺乳动物, 从而制备本发明的抗体, 所述动物如山羊、牛、马、绵羊等, 它们在其乳汁中产生这些抗体。这些动物可以通过已知的方法提供, 见, 例如, 但不限于美国专利 5, 827, 690 ; 5, 849, 992 ; 4, 873, 316 ; 5, 849, 992 ; 5, 994, 616 ; 5, 565, 362 ; 5, 304, 489 等, 在此全文引入作为参考。

[0089] 还可以使用至少一种编码抗双整联蛋白抗体的核酸提供在植物部分或由其培养的细胞中产生所述抗体、特定部分或变体的转基因植物并培养植物细胞 (例如, 但不限于烟草和玉米), 从而制备本发明的抗体。作为非限制性的实例, 已经成功使用表达重组蛋白的烟叶提供大量重组蛋白, 如, 使用诱导型启动子。见, 例如, Cramer et al., *Curr. Top. Microbol. Immunol.* 240 :95-118(1999) 及其中引用的文献。同样, 已经采用转基因玉米以商业生产水平表达哺乳动物蛋白, 其生物活性等于在其它重组系统产生或从天然来源纯化的蛋白。见, 例如 Hood et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 464 :127-147(1999) 及其中引用的文献。也已经从转基因植物种子, 包括烟草种子和马铃薯块根中大量产生了抗体, 包括抗体片段, 例如单链抗体 (scFv' s)。见, 例如 Conrad et al., *Plant Mol. Biol.* 38 :101109(1998) 及其中引用的文献。这样, 也可以根据已知方法采用转基因植物产生本发明的抗体。也见



Fischer et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30 :99-108 (Oct., 1999), Ma et al., *Trends Biotechnol.* 13 :522-7 (1995); Ma et al., *Plant Physiol.* 109 :341-6 (1995); Whitelam et al., *Biochem. Soc. Trans.* 22 :940-944 (1994); 及其中引用的文献。也见一般用于抗体的植物表达的方法, 在此全文引用上述每一篇文献作为参考。

[0090] 本发明的抗体可以以宽范围的亲和性 ( $K_D$ ) 结合人双整联蛋白。在一种优选实施方案中, 本发明的至少一种人单克隆抗体可以任选以高亲和性结合人双整联蛋白。例如, 人单克隆抗体可以与人双整联蛋白结合, 其  $K_D$  等于或小于约  $10^{-7}$ M, 例如, 但不限于 0.1-9.9 (或其中的任意范围或任意值)  $\times 10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-13}$  或其中的任意范围或任意值。

[0091] 抗体与抗原的亲和性或亲和力可以采用适当的方法进行实验室测定。(见, 例如, Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions," *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press; New York, NY (1984); Kuby, Janis Imszluololo, gy, W. H. Freeman and Company; New York, NY (1992); 及此处描述的方法)。如果在不同的条件 (如盐浓度, pH) 下测定, 所测定的特定抗体-抗原相互作用的亲和性可以不同。因此, 优选标准抗体和抗原溶液、标准缓冲液, 如此处描述的缓冲液测量亲和性和其它抗原-抗体结合参数 (例如  $K_D$ ,  $K_a$ ,  $K_d$ )。

[0092] 核酸分子

[0093] 采用这里提供的信息, 如编码 SEQ ID NOS :1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 中的至少一种、其特定片段、变体或共有序列的至少 70-100% 的连续氨基酸的核苷酸序列, 或包含这些序列中的至少一种的保藏载体, 可以根据此处描述或本领域公知的方法获得编码至少一种抗双整联蛋白抗体的本发明的核酸分子。

[0094] 本发明的核酸分子可以是 RNA 形式, 例如 mRNA, hnRNA, tRNA 或任意其它形式, 或可以是 DNA 形式, 包括, 但不限于通过克隆或合成产生, 或其任意组合而产生的 cDNA 和基因组 DNA。DNA 可以是三链、双链或单链, 或其任意组合。DNA 或 RNA 的至少一条链的任意部分可以是编码链, 也称作有义链, 或可以是非编码链, 也称作反义链。

[0095] 本发明的分离核酸分子可以包括含有开放读码框 (ORF), 任选具有一种或多种内含子的核酸分子, 例如, 但不限于至少一种重链 (如 SEQ ID NOS :1-3) 或轻链 (如 SEQ ID NOS :4-6) 的至少一种 CDR, 如 CDR1, CDR2 和 / 或 CDR3 的至少一个特定部分; 包含抗双整联蛋白抗体或可变区的编码序列的核酸分子 (如 SEQ ID NOS :7, 8); 以及包含基本不同于上述那些的核苷酸序列的核酸分子, 但由于遗传密码简并性, 它们仍然编码此处描述和 / 或本领域公知的至少一种抗双整联蛋白抗体。当然, 遗传密码是本领域公知的。因此, 本领域技术人员制备这种编码本发明的特异性抗双整联蛋白抗体的简并核酸变体是常规的。见, 例如, Ausubel, et al., 同上, 这些核酸变体包括在本发明中。本发明的分离核酸分子的非限制性例子包括 SEQ ID NOS :10, 11, 12, 13, 14, 15, 它们分别对应于编码 HC CDR1, HC CDR2, HCCDR3, LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, HC 可变区和 LC 可变区的非限制性的核酸的例子。

[0096] 另一方面, 本发明提供了具有由包含在质粒中的核酸编码的氨基酸序列的抗双整联蛋白抗体的编码分离核酸分子。

[0097] 如此处指出的, 包含编码抗双整联蛋白抗体的核酸的本发明的核酸分子可以包括, 但不限于自身编码抗体片段的氨基酸序列的核酸; 完整抗体或其部分的编码序列; 抗

体、片段或部分的编码序列,以及其它的序列,例如至少一种信号前导肽或融合肽的编码序列,它具有或不具有前面提到的其它编码序列,如至少一种内含子,同时具有其它的非编码序列,包括,但不限于非编码 5' 和 3' 序列,如在转录、mRNA 加工,包括剪接和聚腺苷酸化信号中起作用(例如 mRNA 的核糖体结合和稳定性)的转录的、未翻译的序列;编码其它氨基酸,如提供其它功能的氨基酸的其它序列。因此,编码抗体的序列可以与标记序列融合,例如与促进包含抗体片段或部分的融合抗体纯化的肽的编码序列融合。

[0098] 选择性与此处描述的多核苷酸杂交的多核苷酸

[0099] 本发明提供了在选择性杂交条件下与此处公开的多核苷酸杂交的分离核酸。因此,该实施方案中的多核苷酸可以用于分离、检测和/或定量包含所述多核苷酸的核酸。例如,本发明的多核苷酸可以用于在保藏的文库中鉴定、分离或扩增部分或全长克隆。在一些实施方案中,多核苷酸是分离的基因组或 cDNA 序列,或者互补于来自于人或哺乳动物核酸文库的 cDNA。

[0100] 优选地,cDNA 文库包含全长序列的至少 80%,优选包含全长序列的至少 85% 或 90%,更优选包含全长序列的至少 95%。可以对 cDNA 文库进行标准化,以增加稀有序列的代表性。低或中度严格杂交条件一般,但不是专门用于相对于互补序列的序列等同性较低的序列。中度和高度严格性条件任选用于具有更高等同性的序列。低严格性杂交条件允许具有约 70% 的序列等同性的序列的选择性杂交,并且可以用于鉴定直向同源序列或共生同源序列。

[0101] 本发明的多核苷酸任选编码由此处描述的多核苷酸编码的抗体的至少一部分。本发明的多核苷酸包括可以用于与编码本发明的抗体的多核苷酸选择性杂交的核酸序列。见,例如 Ausubel,同上;Colligan,同上,在此全文引入作为参考。

[0102] 核酸的构建

[0103] 本发明的分离核酸可以利用本领域公知的 (a) 重组方法,(b) 合成技术,(c) 纯化技术或其组合进行制备。

[0104] 核酸可以方便地包含除本发明的多核苷酸以外的序列。例如,可以将包含一个或多个内切核酸酶限制位点的多克隆位点插入核酸,以帮助多核苷酸的分离。也可以插入可翻译的序列以帮助本发明的被翻译的多核苷酸的分离。例如,一种六组氨酸标记序列提供了纯化本发明的蛋白的方便方法。除编码序列外,本发明的核酸任选为用于克隆和/或表达本发明的多核苷酸的载体、连接物或接头。

[0105] 在这种克隆和/或表达序列中也可以加入其它序列,用于优化它们在克隆和/或表达中的功能,用于帮助多核苷酸的分离,用于改进多核苷酸向细胞中的导入。克隆载体、表达载体、连接物和接头的用途是本领域中公知的。(See, e. g., Ausubel, 同上;或 Sambrook, 同上)。构建核酸的重组方法

[0106] 本发明的分离核酸组合物,如 RNA, cDNA, 基因组 DNA 或其任意组合可以用本领域技术人员公知的任何克隆方法从生物来源中获得。在一些实施方案中,在严格条件下选择性与本发明的多核苷酸杂交的寡核苷酸探针被用于鉴定 cDNA 或基因组 DNA 文库中的所需序列。RNA 的分离和 cDNA 以及基因组文库的构建是本领域普通技术人员所公知的。(见,例如 Ausubel, 同上;或 Sambrook, 同上)。

[0107] 核酸筛选和分离方法

[0108] 可以采用基于本发明的多核苷酸序列的探针筛选 cDNA 或基因组文库,如此处所公开。可以用探针与基因组 DNA 或 cDNA 序列杂交,以分离相同或不同生物体中的同源基因。本领域技术人员将理解,在测定中可以使用不同严格性程度的杂交,杂交或洗涤介质中的任意一个都可以是严格的。当杂交条件更严格时,探针和靶序列之间的互补性必须更高,这样才能形成双链体。严格性程度可以由温度、离子强度、pH 和甲酰胺等部分变性溶剂的存在中的一个或多个条件进行控制。例如,杂交的严格性可以通过改变反应物溶液的极性而方便地改变,反应物溶液的极性可以通过例如在 0% -50% 的范围内操作甲酰胺的浓度而改变。可检测的结合所要求的互补性程度(序列等同性)将根据杂交介质和 / 或洗涤介质的严格性而改变。互补性程度最佳为 100% 或 70-100%, 或其中的任意范围或任意值。然而,应该理解,探针和引物中的小量序列变异可以通过减少杂交和 / 或洗涤介质的严格性而补偿。

[0109] 扩增 RNA 或 DNA 的方法是本领域公知的,可以根据此处的教导和指导用于本发明,而不需要过多的实验。

[0110] 已知的扩增 RNA 或 DNA 的方法包括,但不限于聚合酶链式反应 (PCR) 和相关的扩增方法(见,例如, Mullis 等的美国专利 4,683,195,4,683,202,4,800,159,4,965,188; Tabor 等的 4,795,699 和 4,921,794; Innis 的 5,142,033; Wilson 等的 5,122,464; Innis 的 5,091,310; Gyllensten 等的 5,066,584; Gelfand 等的 4,889,818; Silver 等的 4,994,370; Biswas 的 4,766,067; Ringold 的 4,656,134) 和 RNA 介导的扩增,该扩增中使用靶序列的反义 RNA 作为模板用于双链 DNA 合成 (Malek 等的美国专利 5,130,238,商品名为 NASBA),在此全文引入所有参考文献作为参考。(见,例如 Ausubel, 同上; 或 Sambrook, 同上。)

[0111] 例如,可以用聚合酶链式反应 (PCR) 技术从基因组 DNA 或 cDNA 文库直接扩增本发明的多核苷酸序列和相关基因。也可以用 PCR 和其它体外扩增方法克隆需要表达的蛋白的编码核酸序列,制备用于检测样品中是否存在所需 mRNA 的探针,对核酸测序,或其它目的。足够指导技术人员使用体外扩增方法的技术的例子见, Berger, 同上, Sambrook, 同上, 和 Ausubel, 同上, 以及 Mullis 等的美国专利 4,683,202 (1987); 以及 Innis 等, PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990)。用于基因组 PCR 扩增的商品化试剂盒是本领域已知的。见,例如, Advantage-2C 基因组 PCR 试剂盒 (Clontech)。此外,如 T4 基因 32 蛋白 (Boehringer Mannheim) 可以用于改进长 PCR 产物的产率。

[0112] 构建核酸的合成方法

[0113] 本发明的分离核酸也可以根据已知方法通过直接化学合成而制备(见,例如 Ausubel 等, 同上)。化学合成一般产生单链核苷酸,该单链核苷酸可以通过与互补序列杂交或通过用单链作为模板,采用 DNA 聚合酶进行聚合而转化为双链 DNA。本领域技术人员了解,尽管 DNA 的化学合成可以限制在约 100 或更多碱基的序列,也可以通过较短序列的连接获得较长的序列。

[0114] 重组表达盒

[0115] 本发明进一步提供了包含本发明的核酸的重组表达盒。本发明的核酸序列,例如,编码本发明的抗体的 cDNA 或基因组序列可以用于构建重组表达盒,该表达盒可以被导入至少一种需要的宿主细胞。重组表达盒一般包含本发明的多核苷酸,该多核苷酸可操作性地

连接于指导多核苷酸在目的宿主中转录的转录起始调节序列。异源性和非源性（即内源性）启动子可以用于指导本发明的核酸分子的表达。

[0116] 在一些实施方案中,作为启动子、增强子或其它元件的分离核酸可以导入本发明的多核苷酸的非同源形式中的适当位置（位于内含子上游、下游或内部）,以便上调或下调本发明的多核苷酸的表达。例如,可以通过突变、去除和/或取代而体内或体外改变内源性启动子。

[0117] 载体和宿主细胞

[0118] 本发明也涉及包含本发明的分离核酸分子的载体,用重组载体基因工程化的宿主细胞,以及通过本领域公知的重组技术产生至少一种抗双整联蛋白抗体。见,例如, Sambrook 等,同上; Ausubel 等,同上,在此全文引入作为参考。

[0119] 多核苷酸可以任选与含有可选择标记的载体连接,用于在宿主中增殖。一般地,将质粒载体导入一种沉淀物,例如磷酸钙沉淀,或导入具有带电脂质的复合物。如果载体是病毒,可以用适当的包装细胞系将其包装后转导至宿主细胞。

[0120] DNA 插入物可以操作性与适当启动子连接。表达构建体进一步包含转录起始位点、转录终止位点和转录区中的位点,以及用于翻译的核糖体结合位点。由构建体表达的天然转录物的编码部分将优选包含位于起始处的翻译起始密码子和位于被翻译的 mRNA 末端适当位置的终止密码子（如 UAA, UGA 或 UAG）,哺乳动物或真核细胞表达优选采用 UAA 和 UAG。

[0121] 表达载体优选但任选包含至少一种可选择标记。这些标记包括,例如,但不限于真核细胞培养物的氨甲喋呤 (MTX)、二氢叶酸还原酶 (DHFR, 美国专利 4, 399, 216 ; 4, 634, 665 ; 4, 656, 134 ; 4, 956, 288 ; 5, 149, 636 ; 5, 179, 017)、氨苄青霉素、新霉素 (G418)、霉酚酸或谷氨酰胺合成酶 (GS, 美国专利 5, 122, 464 ; 5, 770, 359 ; 5, 827, 739) 抗性基因,以及大肠杆菌和其它细菌或原核生物的四环素或氨苄青霉素抗性基因（上述专利在此全文引入作为参考）。上述宿主细胞的适当培养基和培养条件是本领域公知的。适当的载体是本领域技术人员容易理解的。可以通过磷酸钙转染、DEAE- 右旋糖苷介导的转染、阴离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染或其它已知方法将载体构建体导入宿主细胞。这些方法在本领域有描述,例如 Sambrook, 同上, 1-4 和 16-18 章; Ausubel, 同上, 1, 9, 13, 15, 16 章。

[0122] 本发明的至少一种抗体可以以修饰的形式,例如以融合蛋白的形式表达,并且可以包括分泌信号和其它同源功能区。例如,其它的氨基酸区域,特别是带电氨基酸区域可以添加至抗体的 N 端以改进纯化或随后的加工和储存过程中在宿主中的稳定性和耐受性。也可以将本发明的肽部分添加至本发明的抗体,以促进纯化。这些区域可以在抗体或其至少一个片段的最终制备之前去除。这些方法描述于许多实验室手册,例如 Sambrook, 同上, 17. 29-17. 42 和 18. 1-18. 74 章; Ausubel, 同上, 16, 17 和 18 章。

[0123] 本领域普通技术人员了解,许多表达系统都可以用于表达编码本发明的蛋白的核酸。

[0124] 作为选择,本发明的核酸可以通过在包含编码本发明的抗体的内源性 DNA 的宿主细胞中打开 (turning on) (通过操作) 而在宿主细胞中表达。这些方法是本领域公知的,如描述于美国专利 5, 580, 734, 5, 641, 670, 5, 733, 746, 和 5, 733, 761, 在此引入每一篇专利作为参考。

[0125] 用于产生抗体、其特定部分或变体的示例性的细胞培养物为哺乳动物细胞。哺

乳动物细胞系统一般是单层细胞的形式,但也可以使用哺乳动物细胞悬浮液或生物反应器。本领域中已经开发了许多能够表达完整糖基化蛋白的适当宿主细胞系,包括 COS-1(如 ATCC CRL 1650), COS-7(如 ATCC CRL1651), HEK293, BHK21(如 ATCC CRL-10), CHO(如 ATCC CRL 1610) 和 BSC-1(如 ATCC CRL-26) 细胞系, Cos-7 细胞, CHO 细胞, hep G2 细胞, P3X63Ag8. 653, SP2/0-Ag14, 293 细胞, HeLa 细胞等,它们可以容易从例如美国典型培养物保藏中心 Manassas, Va(www.atcc.org) 获得。特别优选的宿主细胞是 P3X63Ag8. 653 细胞(ATCC 保藏号 CRL-1580) 和 SP2/0-Ag14 细胞(ATCC 保藏号 CRL-1851)。在一种特别优选的实施方案中,重组细胞是 P3X63Ab8. 653 或 SP2/0-Ag14 细胞。

[0126] 这些细胞的表达载体可以包含一种或多种以下表达控制序列,例如,但不限于复制起点;启动子(如晚期或早期 SV40 启动子,CMV 启动子(美国专利 5,168,062;5,385,839)、HSV tk、pgk(磷酸甘油酯激酶)启动子、EF-1 $\alpha$  启动子(美国专利 5,266,491)、至少一种人类免疫球蛋白启动子);增强子和/或加工信号位点,例如核糖体结合位点, RNA 剪接位点、聚腺苷酸化位点(如 SV40 大 T Ag 聚腺苷酸添加位点)和转录终止子序列。见,例如 Ausubel 等,同上;Sambrook,等,同上。其它用于产生本发明的核酸或蛋白的细胞是已知的和/或可得到的,例如从美国典型培养物保藏中心细胞系和杂交瘤目录(www.atcc.org) 或商业来源得到。

[0127] 当使用真核宿主细胞时,一般将聚腺苷酸化或转录终止子序列掺入载体。终止子序列的一个例子是来自于牛生长激素基因的聚腺苷酸化序列。也可以包括用于准确剪接转录物的序列。剪接序列的一个例子是 SV40 的 VP1 内含子(Sprague, et al., J. Virol. 45: 773-781(1983))。此外,用于控制宿主细胞中复制的基因序列可以掺入本领域公知的载体中。

[0128] 抗体的纯化

[0129] 可以通过公知的方法从重组细胞培养物中回收并纯化抗双整联蛋白抗体,所述方法包括,但不限于,蛋白 A 纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阴离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水相互作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析。也可以采用高效液相层析("HPLC") 进行纯化。见,例如, Colligan, Current Protocols in Immunology, 或 Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), 例如 1, 4, 6, 8, 9, 10 章,在此全文引入作为参考。

[0130] 本发明的抗体包括天然纯化产物,化学合成程序产物,以及通过重组技术从酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞等真核宿主产生的产物。根据在重组产生程序中使用的宿主,本发明的抗体可以被糖基化或可以未糖基化,优选被糖基化。这些方法描述于许多实验室手册,例如 Sambrook, 同上, 17. 37-17. 42 部分; Ausubel, 同上, 10, 12, 13, 16, 18 和 20 章; Colligan, Protein Science, 同上, 12-14 章,在此全文引入所有这些文献作为参考。

[0131] 抗双整联蛋白抗体

[0132] 本发明的分离抗体包含由任意适当的多核苷酸编码的此处公开的抗体氨基酸序列,或任意分离的或制备的抗体。人抗体或抗原结合片段优选结合人双整联蛋白,并因此部分或基本上中和该蛋白的至少一种生物活性。部分或基本上中和至少一种双整联蛋白或其片段的生物活性的抗体或其特定部分或变体可以结合该蛋白或片段,从而抑制由双整联蛋

白与双整联蛋白受体的结合介导的或其它双整联蛋白依赖性或非依赖性介导的机制。此处用到的术语“中和抗体”是指根据所采用的测定,可以抑制约 20-120%,优选至少约 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% 的双整联蛋白依赖性活性的抗体。抗双整联蛋白抗体抑制双整联蛋白依赖性活性的能力优选通过至少一种适当的双整联蛋白或受体测定方法进行评估,如此处的描述和 / 或本领域公知。本发明的人抗体可以是任意类型 (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD 等) 或同种型,可以包含  $\kappa$  或  $\lambda$  轻链。在一种实施方案中,人抗体包含一个 IgG 重链或限定的片段,例如,同种型 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 中的至少一种。这种类型的抗体可以通过使用含有至少一种人轻链 (如 IgG, IgA 和 IgM (如  $\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \gamma 4$ )) 转基因的转基因小鼠或其它转基因非人哺乳动物制备,如此处的描述和 / 或本领域所公知。在另一种实施方案中,抗人双整联蛋白人抗体包含一个 IgG1 重链和一个 IgG1 轻链。

[0133] 本发明的至少一种抗体结合至少一种特异于双整联蛋白、其亚基、片段、部分或其任意组合的至少一种特定表位。所述至少一种表位包含至少一个抗体结合区,该区包含所述蛋白的至少一部分,该表位优选由所述蛋白的至少一个细胞外、可溶性、亲水性、外部或细胞质部分组成。所述至少一种特定表位可以包含 SEQ ID NOs :9, 16 或 17 的至少 1-3 个氨基酸至 SEQ ID NOs :9, 16 或 17 的连续氨基酸的完整特定部分的任意组合。

[0134] 本发明的人抗体或抗原结合片段一般将包含一个抗原结合区,该区包含至少一个重链可变区的至少一个人互补决定区 (CDR1, CDR2 和 CDR3) 或变体和至少一个轻链可变区的至少一个人互补决定区 (CDR1, CDR2 和 CDR3) 或至少变体。作为非限制性的实例,抗体或抗原结合部分或变体可以包含至少一种具有 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列的重链 CDR3, 和 / 或具有 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列的轻链 CDR3。在一种特定的实施方案中,抗体或抗原结合片段可以具有一种抗原结合区,该区包含具有相应 CDR1, CDR2 和 / 或 CDR3 的氨基酸序列 (如 SEQ ID NOS :1, 2 和 / 或 3) 的至少一个重链 CDR (即 CDR1, CDR2 和 / 或 CDR3) 的至少一部分。在另一种特定实施方案中,抗体或抗原结合部分或变体可以具有一种抗原结合区,该区包含具有相应 CDR1, CDR2 和 / 或 CDR3 的氨基酸序列 (如 SEQ ID NOS :4, 5 和 / 或 6) 的至少一个轻链 CDR (即 CDR1, CDR2 和 / 或 CDR3) 的至少一部分。在一种优选实施方案中,抗体或抗原结合片段的三种重链 CDR 和三种轻链 CDR 具有单克隆抗体 TNV148, TNV14, TNV15, TNV196, TNV15, TNV118, TNV32, TNV86 中的至少一种的相应 CRD 的氨基酸序列,如此处的描述。可以使用常规技术通过将抗体的各种部分 (如 CDR、构架区) 化学连接在一起而制备这些抗体,也可以通过常规重组 DNA 技术或任何其它适当方法制备和表达一种 (即一种或多种) 编码抗体的核酸分子而制备这些抗体。

[0135] 抗双整联蛋白抗体可以包含至少一种具有确定氨基酸序列的重链或轻链可变区。例如,在一种优选实施方案中,抗双整联蛋白抗体包含至少一种任选具有 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列的重链可变区和 / 或至少一种任选具有 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列的轻链可变区。结合于人双整联蛋白的抗体和包含确定的重链和轻链可变区的抗体可以用适当方法制备,例如噬菌体展示 (Katsube, Y., et al., Int J Mol. Med, 1(5) :863-868 (1998)) 或使用转基因动物的方法,如本领域所公知和 / 或此处所描述。例如,可以用人双整联蛋白或其片段免疫转基因小鼠以诱导抗体的产生,该转基因小鼠包含功能性重排的人免疫球蛋白重链转基因和包含来源于能够进行功能性重排的人免疫球蛋白轻链基因座的转基因。如果需

要,可以采用此处描述的和 / 或本领域公知的方法分离抗体产生细胞以及制备杂交瘤或其它永生化的抗体产生细胞。作为选择,可以在适当宿主细胞中用其编码核酸或其部分表达抗体、其特定部分或变体。

[0136] 本发明也涉及包含与此处描述的氨基酸序列基本相同的序列中的氨基酸的抗体、抗原结合片段、免疫球蛋白链和 CDR。这些抗体或抗原结合片段和包含所述链或 CDR 的抗体可以以高亲和性 (如  $K_D$  小于或等于约  $10^{-9}M$ ) 与人双整联蛋白结合。与此处描述的序列基本相同的氨基酸序列包括含有保守氨基酸取代和氨基酸去除和 / 或插入的序列。保守氨基酸取代是指,用具有与第一种氨基酸相似的化学和 / 或物理特性 (如电荷、结构、极性、疏水性 / 亲水性) 的第二种氨基酸代替第一种氨基酸。保守氨基酸取代包括用下列各组中的一种氨基酸代替另一种氨基酸: 赖氨酸 (K)、精氨酸 (R) 和组氨酸 (H); 天冬氨酸 (D) 和谷氨酸 (E); 天冬酰胺 (N), 谷氨酰胺 (Q), 丝氨酸 (S), 苏氨酸 (T), 酪氨酸 (Y), K, R, H, D 和 E; 丙氨酸 (A), 缬氨酸 (V), 亮氨酸 (L), 异亮氨酸 (I), 脯氨酸 (P), 苯丙氨酸 (F), 色氨酸 (W), 甲硫氨酸 (M), 半胱氨酸 (C) 和甘氨酸 (G) F, W 和 Y; C, S 和 T。

[0137] 氨基酸代码

[0138] 组成本发明的抗双整联蛋白抗体的氨基酸通常以缩写表示,可以通过单字母代码、三字母代码、名称或三核苷酸密码子表示氨基酸,这是本领域公知的 (见 (see Alberts, B., et al., Molecular Biology of The Cell, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994) :

[0139]

单字母代码	三字母代码	名称	三核苷酸密码子
A	Ala	丙氨酸	GCA, GCC, GCG, GCU
C	Cys	半胱氨酸	UGC, UGU
D	Asp	天冬氨酸	GAC, GAU
E	Glu	谷氨酸	GAA, GAG
F	Phe	苯丙氨酸	UUC, UUU
G	Gly	甘氨酸	GGA, GGC, GGG, GGU
H	His	组氨酸	CAC, CAU
I	Ile	异亮氨酸	AUA, AUC, AUU
K	Lys	赖氨酸	AAA, AAG

单字母代码	三字母代码	名称	三核苷酸密码子
L	Leu	亮氨酸	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
M	Met	甲硫氨酸	AUG
N	Asn	天冬酰胺	AAC, AAU
P	Pro	脯氨酸	CCA, CCC, CCG, CCU
Q	Gln	谷氨酰胺	CAA, CAG
R	Arg	精氨酸	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
S	Ser	丝氨酸	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
T	Thr	苏氨酸	ACA, ACC, ACG, ACU
V	Val	缬氨酸	GUA, GUC, GUG, GUU
W	Trp	色氨酸	UGG
Y	Tyr	酪氨酸	UAC, UAU

[0140] 本发明的双整联蛋白抗体可以包括这里所指出的通过天然突变或人工操作导致的一个或多个氨基酸取代、去除或添加。

[0141] 当然,技术人员所进行的氨基酸取代的数目将取决于许多因素,包括前面提到的那些。一般说来,任何给定的抗双整联蛋白抗体、片段或变体的氨基酸取代、插入或去除的数目不超过 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 例如 1-30 或其中的任意范围或任意值,如此处所规定。

[0142] 可以通过本领域公知的方法鉴定对功能起关键作用的本发明的抗双整联蛋白抗体中的氨基酸,如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(如 Ausubel, 同上, 8, 15 章; Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085(1989))。后一种程序在分子中每个残基处导入单个丙氨酸突变。然后检测得到的突变分子的生物活性,例如,但不限于至少一种双整联蛋白



中和活性。也可以通过结晶、核磁共振或光亲和性标记等结构分析鉴定抗体结合的关键位点 (Smith, et al., J. Mol. Biol. 224 :899-904(1992) and deVos, et al., Science 255 :306-312(1992))。

[0143] 本发明的抗双整联蛋白抗体可以包括,但不限于选自 SEQ ID NOS :1, 2, 3, 4, 5, 6 中至少一个的 5 个至所有连续氨基酸的至少一种部分、序列或组合。

[0144] 本发明的抗双整联蛋白抗体可以进一步任选包含一种具有 SEQ ID NOS :7, 8 中的至少一个的 70-100% 的连续氨基酸的多肽。

[0145] 在一种实施方案中,免疫球蛋白链的氨基酸序列或其部分(如可变区、CDR)与 SEQ ID NOS :7, 8 中的至少一个的相应链的氨基酸序列具有约 70-100% 的等同性(如 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 或其中的任意范围或任意值)。例如,轻链可变区的氨基酸序列可以与 SEQ ID NO :8 的序列相似,或重链 CDR3 的氨基酸序列可以与 SEQ ID NO :7 相似。优选地,用本领域公知的适当计算机算法确定出具有 70-100% 的氨基酸等同性(即 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 或其中的任意范围或任意值)。

[0146] 示例性的重链和轻链可变区序列见 SEQ ID NOS :7, 8。本发明的抗体或其特定变体可以包含来源于本发明的一种抗体的任意数目的连续氨基酸,其中该数目选自抗双整联蛋白抗体中连续残基数目的 10-100%。该连续氨基酸的亚序列长度为至少约 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 或更多,或其中的任意范围或任意值。此外,这些亚序列的数目可以是选自 1-20 的任意整数,例如至少为 2, 3, 4 或 5。

[0147] 本领域技术人员可以理解,本发明包括本发明的至少一种生物活性抗体。生物活性抗体具有天然(非合成)、内源性或相关和已知抗体的至少 20%, 30% 或 40% 的特异活性,优选至少 50%, 60% 或 70%, 最优选具有天然、内源性或相关和已知抗体的至少 80%, 90% 或 95% -1000% 的特异活性。测定和定量测定酶活性和底物特异性的方法是本领域技术人员公知的。

[0148] 另一方面,本发明涉及此处描述的人抗体和抗原结合片段,它们可以通过共价连接有机部分而得到修饰。这种修饰可以产生具有改进的药代动力学特性(如增加的体内血清半衰期)的抗体或抗原结合片段。有机部分可以是线性或分支的疏水聚合物基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。在特定实施方案中,亲水聚合物基团的分子量可以为约 800-120000Da,并且可以是聚链烷醇(如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG))、碳水化合物聚合物、氨基酸聚合物或聚乙烯基吡咯烷酮,脂肪酸或脂肪酸酯基团可以包含约 8-40 个碳原子。

[0149] 本发明的修饰抗体和抗原结合片段可以包含与抗体直接或间接共价结合的一种或多种有机部分。与本发明的抗体或抗原结合片段结合的每一种有机部分可以独立是亲水聚合物基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。这里用到的“脂肪酸”包括单羧酸和二羧酸,这里用到的“亲水聚合物基团”是指在水中比在辛烷中的溶解度更高的有机聚合物。例如,聚赖氨酸在水中比在辛烷中的溶解度更高。因此,本发明包括通过共价连接聚赖氨酸而被修饰的抗体。适于修饰本发明的抗体的亲水聚合物可以是线性的或分支的,可以包括,例如聚链烷醇(如 PEG、单甲氧基-聚乙二醇(mPEG)、PPG 等),碳水化合物(如右旋糖苷、纤维

素、寡糖、多糖等),亲水氨基酸的聚合物(如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚天冬氨酸等),聚环氧烷(如聚环氧乙烷、聚环氧丙烷等)和聚乙烯基吡咯烷酮。修饰本发明的抗体的亲水聚合物作为独立分子实体的分子量优选为约 800-150,000Da。例如,PEG<sub>5000</sub>和 PEG<sub>20,000</sub>,其中下标是以 Da 为单位表示的可以使用的聚合物的分子量。可以用 1 至约 6 个烷基、脂肪酸或脂肪酸酯基团取代亲水聚合物。可以采用适当的方法制备用脂肪酸或脂肪酸酯基团取代的亲水聚合物。例如,包含胺基的聚合物可以与脂肪酸或脂肪酸酯的羧基偶联,脂肪酸或脂肪酸酯的上的活化羧基(如用 N,N-羰基二咪唑活化)可以与聚合物上的羟基偶联。

[0150] 适于修饰本发明的抗体的脂肪酸和脂肪酸酯可以是饱和的或可以包含一个或多个不饱和单元。适于修饰本发明的抗体的脂肪酸包括,例如正十二烷酸(C<sub>12</sub>,月桂酸),正十四烷酸(C<sub>14</sub>,肉豆蔻酸),正十八烷酸(C<sub>18</sub>,硬脂酸),正二十烷酸(C<sub>20</sub>,花生酸),正二十二烷酸(C<sub>22</sub>,山嵛酸),正三十烷酸(C<sub>30</sub>),正四十烷酸(C<sub>40</sub>),顺式- $\Delta$ 9-十八烷酸(C<sub>18</sub>,油酸),全顺式- $\Delta$ 5,8,11,14-二十碳四烯酸(C<sub>20</sub>,花生四烯酸),辛二酸,十四烷二酸,十八烷二酸,二十二烷二酸等。适当的脂肪酸酯包括含有线性或分支低级烷基的二羧酸单酯。低级烷基可以包含 1 个至约 12 个,优选 1 个至约 6 个碳原子。

[0151] 可以通过适当的方法,例如通过与一种或多种修饰剂反应而制备修饰的人抗体和抗原结合片段。此处用到的“修饰剂”是指包括活化基团的适当有机基团(如亲水聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯)。“活化基团”是指在适当条件下,可以与第二种化学基团反应,从而形成修饰剂与第二种化学基团之间的共价键的化学部分或官能团。例如,胺反应性活化基团包括亲电子基团,如甲苯磺酸酯、甲磺酰酯、卤素(氯、溴、氟、碘)、N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS)等。可以与硫醇反应的活化基团包括,例如,马来酰亚胺、碘代乙酰基、丙烯酰基、二硫吡啶、5-硫羟-2-硝基苯甲酸硫醇(TNB 硫醇)等。可以将醛官能团与含有酰胺或酰肼的分子偶联,可以使叠氮基与三价磷酸基反应形成氨基磷酸酯或亚氨代磷酸酯键。用于将活化基团导入分子的适当方法是本领域公知的(见例如, Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques. Academic Press; San Diego, CA(1996))。活化基团可以直接与有机基团(如亲水聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯)结合,或通过接头部分与其结合,所述接头部分例如为二价 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 基团,其中一个或多个碳原子可以被氧、氮或硫等杂原子取代。适当的接头部分包括,例如,四甘醇、-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-,-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-,-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-和 -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-NH-。例如,可以在 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)存在下使单-Boc-烷基二亚胺(如单-Boc-乙二胺、单-Boc-二氨基己烷)与脂肪酸反应,在游离胺和脂肪酸羧基之间形成酰胺键,以便产生包含接头部分的修饰剂。用四氟乙酸(TFA)处理产物,从而使伯胺暴露,可以从产物去除 Boc 保护基,该伯胺可以与上述另一羧基偶联,或可以与马来酸酐反应,将得到的产物环化可以产生被活化的脂肪酸的马来酰亚胺衍生物。(见,例如, Thompson, et al., WO 92/16221,在此引入其完整教导作为参考。)

[0152] 本发明的修饰抗体可以通过使人抗体或抗原结合片段与修饰剂反应而产生。例如,通过采用胺反应性修饰剂,例如,PEG 的 NHS 酯,有机部分可以与抗体以非位点特异性方式结合。也可以通过还原抗体或抗原结合片段的二硫键(如链内二硫键)而制备修饰的人抗体或抗原结合片段。然后可以使被还原的抗体或抗原结合片段与硫醇反应性修饰剂反应,以便产生本发明的修饰抗体。可以采用反向蛋白水解等适当方法制备包含与本发明抗体的特异位点结合的有机部分的修饰人抗体和抗原结合片段(Fisch et

al., *Bioconjugate Chem.*, 3:147-153(1992); Werlenet al., *Bioconjugate Chem.*, 5: 411-417(1994); Kumaran et al., *Protein Sci.* 6(10):2233-2241(1997); Itoh et al., *Bioorg. Chem.*, 24(1):59-68(1996); Capellas et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4): 456-463(1997)), 也可以采用描述于 Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press; San Diego, CA(1996) 中的方法。

[0153] 抗双整联蛋白抗体成分的抗独特型抗体

[0154] 除单克隆抗体或嵌合抗双整联蛋白抗体外, 本发明还涉及特异于本发明的这些抗体的抗独特型(抗 Id) 抗体。抗 Id 抗体是识别独特决定簇的抗体, 所述决定簇一般与另一种抗体的抗原结合区相关。可以用抗体或其含 CDR 的区域免疫与作为 Id 抗体来源的动物相同物种和基因型(如小鼠株) 的动物, 从而制备抗 Id。被免疫的动物将识别免疫抗体的独特型决定簇并对其产生应答, 并且产生抗 Id 抗体。抗 Id 抗体也可以用作“免疫原”以诱导另一动物的免疫应答, 产生所谓的抗-抗独特型抗体。

[0155] 抗双整联蛋白抗体组合物

[0156] 本发明也提供至少一种以天然存在的组合物、混合物或形式提供的抗双整联蛋白抗体组合物, 其中包含此处描述的和/或本领域公知的至少一种、至少两种、至少四种、至少五种、至少六种或更多抗双整联蛋白抗体。这些组合物包括天然存在的组分, 包括抗双整联蛋白抗体氨基酸序列的至少一种或两种全长的序列、C 和/或 N 端去除的变体、结构域、片段、或特定变体, 该抗双整联蛋白抗体氨基酸序列选自 SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 的 70-100% 的连续氨基酸或其特定片段、结构域或变体。优选的抗双整联蛋白抗体组合物包括抗双整联蛋白抗体氨基酸序列的至少一种含 CDR 或 LBR 的部分的至少一种或两种全长的序列、片段结构域或变体, 该抗双整联蛋白抗体氨基酸序列选自 SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6 的 70-100% 的连续氨基酸或其特定片段、结构域或变体。更优选的组合物包含选自 SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6 的 70-100% 的连续氨基酸或其特定片段、结构域或变体中的至少一种的 40-99%。组分百分比是液体或干溶液、混合物、悬浮液、乳状液或胶体的重量、体积、浓度、体积克分子浓度或重量克分子浓度百分比, 如本领域所公知或此处的描述。

[0157] 本发明的抗双整联蛋白抗体可以进一步包含任意适当的有效量的组分或药物组分中的至少一种, 所述组分包括需要这种调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或病人的至少一种抗双整联蛋白抗体, 该组合物任选进一步包含至少一种选自以下物质的组分: 至少一种 TNF 拮抗剂(例如, 但不限于 TNF 抗体或片段、可溶性 TNF 受体或其片段、其融合蛋白、或小分子 TNF 拮抗剂)、抗风湿药物(如氨甲喋呤、金诺芬、金硫葡萄糖、硫唑嘌呤、etanercept、硫代苹果酸金钠、硫酸羟基氯喹、来氟米特、柳氮磺胺吡啶)、肌肉松弛剂、麻醉药(narcotic)、非甾体类抗炎药(NSAID)、镇痛药、麻醉剂(anesthetic)、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂(如氨基糖苷、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、carbapenem、头孢菌素、flurorquinolone、大环内酯、青霉素、磺胺、四环素、其它抗微生物剂)、抗牛皮癣药物、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、糖尿病相关试剂、矿物质、营养剂、甲状腺制剂、维生素、钙相关激素、抗腹泻药、止咳药、抗呕吐药、抗溃疡药、通便药、抗凝剂、促红细胞生成素(如 epoetin  $\alpha$ )、非尔司啉(如 G-CSF, Neupogen)、沙拉斯(GM-CSF, 白细胞素)、疫苗、免疫球蛋白、免疫抑制剂(如 basiliximab、环孢霉素、daclizumab)、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、散瞳剂、睫状肌麻痹剂、烷化剂、抗代谢药、有丝分裂抑

制剂、放射性药物、抗抑郁剂、抗精神病药物、抗躁狂药、抗精神病药物、抗焦虑药、催眠药、拟交感神经药物、刺激剂、donepezil、他克林、抗哮喘药、 $\beta$  激动剂、吸入性类固醇、白三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、9-氨基四氢吡啶、肾上腺素或类似物、 $\alpha$  链道酶 (Pulmozyme)、细胞因子或细胞因子拮抗剂。细胞因子的非限制性实例包括,但不限于 IL-1 至 IL-23 中的任意一种。适当的剂量是本领域公知的。见,例如, Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), 在此全文引入作为参考。

[0158] 这些抗癌或抗感染试剂也可以包括与本发明的至少一种抗体缔合、结合、共同制剂化或共同给药的毒素分子。毒素可以任选选择性杀灭病变细胞或组织。病变细胞可以癌或其它细胞。这些毒素可以是,但不限于,纯化或重组毒素或毒素片段,它包含如选自蓖麻毒素、白喉毒素、蛇毒毒素或细菌毒素中的至少一种的毒素的至少一种功能性细胞毒性结构域。毒素也包括由任意天然存在的、突变或重组细菌或病毒的内毒素和外毒素,它们可以导致人类或其它哺乳动物中的任意病理学状况,包括致死的毒素休克。这些毒素可以包括,但不限于,产肠毒素的大肠杆菌的热不稳定性肠毒素 (LT)、热稳定性肠毒素 (ST)、志贺氏菌细胞毒素、*Aeromonas* 肠毒素、中毒性休克综合征毒素-1 (TSST-1)、葡萄球菌肠毒素 A (SEA), B (SEB) 或 C (SEC)、链球菌肠毒素等。所述细菌包括,但不限于,产肠毒素的大肠杆菌 (ETEC)、肠出血性大肠杆菌 (如血清型 O157:H7 的菌株)、葡萄球菌物种 (如金黄色葡萄球菌、化脓性葡萄球菌)、志贺氏菌物种 (如痢疾志贺氏菌、弗氏志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌和索氏志贺氏菌)、沙门氏菌物种 (如伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌)、梭菌物种 (如产气荚膜梭菌、艰难梭菌、肉毒梭菌)、弯曲杆菌物种 (如空肠弯曲杆菌、胚胎弯曲杆菌)、螺杆菌物种 (如幽门螺杆菌)、气单胞菌物种 (如温和气单胞菌、嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌)、类志贺邻单孢菌、小肠结肠盐耶尔森氏菌、*Vibriosis* 物种 (如霍乱弧菌、副溶血弧菌)、克雷白氏菌物种、铜绿假单孢菌和链球菌。见,例如, Stein, ed., *INTERNAL MEDICINE*, 3rd ed., pp 1-13, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans et al., eds., *Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control*, 2d. Ed., pp 239-254, Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell et al, *Principles and Practice Of Infectious Diseases*, 3d. Ed., Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow et al, eds., *The Merck Manual*, 16th edition, Merck and Co., Rahway, N. J., 1992; Wood et al, *FEMS Microbiology Immunology*, 76:121-134 (1991); Marrack et al, *Science*, 248: 705-711 (1990), 在此全文引入这些参考文献的完整内容作为参考。

[0159] 本发明的抗双整联蛋白抗体化合物、组合物或其组合可以进一步包含任意适当辅助物质,例如,但不限于稀释液、粘合剂、稳定剂、缓冲剂、盐、亲脂溶剂、防腐剂、佐剂等中的至少一种。优选药学可接受的辅助物质。这些无菌溶液的非限制性的例子和制备方法是本领域公知的,例如,但不限于 Gennaro, Ed., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18<sup>th</sup> Edition, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990。可以常规选择药学可接受的载体,这些载体适于抗双整联蛋白抗体、片段或变体组合物的给药方式、溶解度和 / 或稳定性,如本领域公知或此处的描述。

[0160] 用于本发明的组合物的药物赋形剂和添加剂包括,但不限于蛋白、肽、氨基酸、脂

质和碳水化合物（如糖，包括单糖、双糖、三糖、四糖和寡糖；衍生糖，如醛醇、醛酸、酯化糖等；以及多糖或糖聚合物），可以单个或组合存在，单独或组合占重量或体积 1-99.99%。示例性的蛋白赋形剂包括血清白蛋白，如人血清白蛋白（HSA）、重组人白蛋白（rHA）、明胶、酪蛋白等。可以起缓冲作用的代表性氨基酸 / 抗体成分包括丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺等。一种优选的氨基酸是甘氨酸。

[0161] 适用于本发明的碳水化合物赋形剂包括，例如单糖，如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等；双糖，如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等；多糖，如棉籽糖、松三糖、麦芽糖糊精、右旋糖苷、淀粉等；以及醛醇，如甘露醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇、山梨糖醇（葡萄糖醇）、肌醇等。用于本发明的优选的碳水化合物赋形剂是甘露醇、海藻糖和棉籽糖。

[0162] 抗双整联蛋白抗体组合物也可以包含缓冲剂或 pH 调节剂；一般地，缓冲剂是由有机酸或碱制备的盐。代表性的缓冲剂包括有机酸盐，例如柠檬酸、抗坏血酸、葡萄糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的盐；Tris，盐酸 tromethamine、或磷酸缓冲液。用于本发明的组合物中的优选缓冲剂是有机酸盐如柠檬酸盐。

[0163] 此外，本发明的抗双整联蛋白抗体组合物可以包含聚合物赋形剂 / 添加剂，如聚乙烯基吡咯烷酮、ficolls（一种聚合的糖）、dextrates（如环糊精，例如 2-羟基丙基-β-环糊精）、聚乙二醇、矫味剂、抗微生物剂、增甜剂、抗氧化剂、抗静电剂、表面活性剂（如聚山梨醇酯，例如“TWEEN 20”和“TWEEN 80”）、脂质（如磷脂、脂肪酸）、类固醇（如胆固醇）和螯合剂（如 EDTA）。

[0164] 适用于抗双整联蛋白抗体、部分或变体组合物的这些和其它已知药物赋形剂和 / 或添加剂是本领域公知的，例如，列于“Remington: The Science & Practice of Pharmacy”，19th ed., Williams & Williams, (1995), 和“Physician's Desk Reference”，52nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), 在此引入其完整公开内容作为参考。优选的载体或赋形剂物质是碳水化合物（如糖和醛醇）和缓冲剂（如柠檬酸盐）或聚合剂。

[0165] 制剂

[0166] 如前面所指出的，本发明提供了稳定的制剂，优选为含有盐或选择的盐的磷酸缓冲液，以及含有防腐剂的储存溶液和制剂，适于药用或兽医用途的多用途储存制剂，它包含置于药学可接受制剂中的至少一种抗双整联蛋白抗体。储存制剂包含至少一种已知的防腐剂或任选自至少一种苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、亚硝酸苯汞、苯氧基乙醇、甲醛、氯丁醇、氯化镁（如六水合物）、对羟基苯甲酸烷基酯（甲基、乙基、丙基、丁基等）、苯扎氯铵、苯索氯铵、脱氢乙酸钠和乙基汞硫代水杨酸钠，或其在水性稀释液中的混合物。可以使用本领域公知的任何适当浓度或混合物，例如 0.001-5%，或其中的任意范围或任意值，例如，但不限于，0.001, 0.003, 0.005, 0.009, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.3, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 或其中的任意范围或任意值。非限制性实例包括，无防腐剂，0.1-2% 间甲酚（如 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.9, 1.0%），0.1-3% 苯甲醇（如

0.5, 0.9, 1.1, 1.5, 1.9, 2.0, 2.5%) , 0.001-0.5% 乙基汞硫代水杨酸钠 (如 0.005, 0.01) , 0.001-2.0% 苯酚 (如 0.05, 0.25, 0.28, 0.5, 0.9, 1.0%) , 0.0005-1.0% 对羟基苯甲酸烷基酯 (如 0.00075, 0.0009, 0.001, 0.002, 0.005, 0.0075, 0.009, 0.01, 0.02, 0.05, 0.075, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.75, 0.9, 1.0%) 等。

[0167] 如前面所指出的, 本发明提供了一种制品, 包括包装材料和至少一个管形瓶, 其中包含至少一种抗双整联蛋白抗体的溶液和规定的缓冲剂和 / 或防腐剂, 任选溶于一种水性稀释液, 其中所述包装材料包括一种标签, 它指出所述溶剂可以保留 1、2、3、4、5、6、9、12、18、20、24、30、36、40、48、54、60、66、72 小时或更长的时间。本发明进一步包括一种制品, 包括包装材料和含有至少一种冷冷冻干燥的抗双整联蛋白抗体的第一个管形瓶, 和含有规定的缓冲剂或防腐剂的水性稀释液的第二个管形瓶, 其中包装材料包括一种标签, 它指导患者在水性稀释液中重构至少一种抗双整联蛋白抗体, 以便形成可以保留 24 小时或更长时间的溶液。

[0168] 根据本发明而使用的至少一种抗双整联蛋白抗体可以通过重组方法产生, 包括从哺乳动物细胞或转基因制剂重组产生, 或者从其它生物来源纯化, 如此处所描述或本领域公知。

[0169] 在本发明的产品中的至少一种抗双整联蛋白抗体的范围包括在湿 / 干体系中重构时, 产生约 1.0  $\mu$ g/ml 至约 1000mg/ml 的量, 但更低和更高的浓度也是可行的, 并且依赖于准备使用的递送载体, 例如, 溶液制剂将不同于经皮贴剂、肺、经粘膜或渗透或微泵方法。

[0170] 优选地, 水性稀释液任选进一步包含药学可接受的防腐剂, 优选的防腐剂包括选自苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸烷基酯 (甲基、乙基、丙基、丁基等)、苯扎氯铵、苯索氯铵、脱氢乙酸钠和乙基汞硫代水杨酸钠, 或其混合物的那些。用于制剂中的防腐剂的浓度为足以产生抗微生物作用的浓度。这些浓度取决于选择的防腐剂, 并且本领域技术人员很容易确定。

[0171] 可以任选和优选将其它赋形剂, 如等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、防腐增强剂加入稀释液中。甘油等等渗剂通常以公知的浓度使用。优选加入生理耐受的缓冲剂以改进 pH 控制。制剂可以有宽范围的 pH 值, 例如 pH 约 4-10, 优选 pH 约 5-9, 最优选约 6.0-8.0。本发明的制剂的 pH 优选为约 6.8-7.8。优选的缓冲剂包括磷酸缓冲液, 最优选为磷酸盐, 特别是磷酸缓冲盐水 (PBS)。

[0172] 也可以任选向制剂或组合物中加入其它添加剂, 如药学可接受的增溶剂, 如 Tween 20 (聚氧乙烯 (20) 山梨糖醇酐单月桂酸酯)、Tween 40 (聚氧乙烯 (20) 山梨糖醇酐单棕榈酸酯)、Tween 80 (聚氧乙烯 (20) 山梨糖醇酐单油酸酯)、Pluronic F68 (聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物) 和 PEG (聚乙二醇) 或非离子型表面活性剂, 例如聚山梨糖醇酯 20 或 80、或 poloxamer 184 或 188、**Pluronic**<sup>®</sup>多元醇其它共聚物, 以及螯合剂如 EDTA 和 EGTA, 以减少聚集。如果用泵或塑料容器给予制剂, 则这些添加剂特别有用。药学可接受的表面活性剂的存在减少了蛋白聚集的倾向。

[0173] 可以通过以下方法制备本发明的制剂, 包括将至少一种抗双整联蛋白抗体和选自苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸烷基酯 (甲基、乙基、丙基、丁基等)、苯扎氯铵、苯索氯铵、脱氢乙酸钠和乙基汞硫代水杨酸钠, 或其混合物在一种水性稀释液中混合。采用常规的溶解和混合步骤在一种水性稀释液中混合所述至少一种抗双整联

蛋白抗体和防腐剂。为了制备适当的制剂,例如,可以将测得量的溶于缓冲液中的至少一种抗双整联蛋白抗体在其量足以提供需要浓度的蛋白和防腐剂的缓冲液中混合。本领域技术人员可以了解该方法的变化。例如,加入各成分的顺序、是否使用其它添加剂、制备该制剂的温度和 pH 都是可以对使用的浓度和给药方式进行优化的因素。

[0174] 可以将本发明的制剂以澄清的溶液或作为双管形瓶的形式提供给患者,双管形瓶包含一个装有至少一种冷冷冻干燥的抗双整联蛋白抗体的管形瓶,将其用含有水、防腐剂和 / 或赋形剂,优选磷酸缓冲剂和 / 或盐水和溶于水性稀释液中的选择的盐的第二个管形瓶重构。单一溶液的管形瓶或要求重构的双管形瓶可以重复使用多次,并且可以满足病人治疗的单个或多个周期,因此比当前存在的方法提供更方便的治疗方案。

[0175] 本发明的制品可用于在 24 小时左右或更长的时间内给药。因此,本发明的制备为患者提供了显著的优势。本发明的制剂任选可以储存在约 2-40°C 的温度下储存,并且在长时间保持蛋白的生物活性,因此,包装标签指出,该溶液可以在超过 6、12、18、24、36、48、72 或 96 小时的时间内保留和 / 或使用。如果使用了储存稀释液,该标签指出,该溶液可以在 1-12 个月,半年,一年半和 / 或两年的时间用内用完。

[0176] 本发明中的至少一种抗双整联蛋白抗体溶液可以通过包括在水性稀释液中混合至少一种抗体的方法而制备。采用常规的溶解和混合步骤进行混合。为了制备适当的稀释液,例如,可以将测得量的溶于水或缓冲液中的至少一种抗体以足以提供所需浓度的蛋白和任选的防腐剂或缓冲液量混合。本领域技术人员可以了解该方法的变化。例如,加入各成分的顺序、是否使用其它添加剂、制备该制剂的温度和 pH 都是可以对使用的浓度和给药方式进行优化的因素。

[0177] 本发明的产品可以以澄清的溶液或作为双管形瓶的形式提供给患者,双管形瓶包含一个装有至少一种冷冷冻干燥的抗双整联蛋白抗体的管形瓶,将其用含有水性稀释液的第二个管形瓶重构。单一溶液的管形瓶或要求重构的双管形瓶可以重复使用多次,并且可以满足病人治疗的单个或多个周期,因此比当前存在的方法提供更方便的治疗方案。

[0178] 本发明的产品可以以澄清的溶液或作为双管形瓶的形式提供给药店、诊所、或其它机构和设施,从而直接提供给患者,其中双管形瓶包含一个装有至少一种冷冷冻干燥的抗双整联蛋白抗体的管形瓶,将其用含有水性稀释液的第二个管形瓶重构。此情况下的澄清溶液最多可达 1 升或甚至更多,提供于大的储存容器,从中可以一次或多次取出至少一种抗体溶液的更小部分,将其转移至更小的管形瓶中,由药店或诊所提供给客户和 / 或病人。

[0179] 公认的包括这些单个管形瓶体系的设备包括用于递送溶液的笔式注射器,例如 BD Pens, BD **Autojector**<sup>®</sup>, **Humaject**<sup>®</sup>, **NovoPen**<sup>®</sup>, **B-DPen**<sup>®</sup>, **AutoPen**<sup>®</sup>, 以及 **OptiPen**<sup>®</sup>, **GenotropinPen**<sup>®</sup>, **GenotroNorm Pen**<sup>®</sup>, **Humatro Pen**<sup>®</sup>, **Reco-Peno**<sup>®</sup>, **Roferon Pen**<sup>®</sup>, **Biojector**<sup>®</sup>, **iject**<sup>®</sup>, **J-tipNeedle-Free Injector**<sup>®</sup>, **Intraject**<sup>®</sup>, **Medi-Ject**<sup>®</sup>, 如由以下公司生产: Becton Dickenson (Franklin, Lakes, NJ, www.bectondickenson.com), Disetronic (Burgdorf, Switzerland, www.disetronic.com); Bioject, Portland, Oregon (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, UK, www.weston-medical.

com), Medi-Ject Corp (Minneapolis, MN, www.mediject.com)。公认的包括双管形瓶的设备包括用于在药筒中递送重构的冷冷冻干燥药物的笔式注射器系统, 例如 **HumatroPen®**。

[0180] 当前要求保护的产品包括包装材料。除了管理部门要求的信息, 包装材料提供了可以使用该产品的条件。本发明的包装材料为病人提供了用两个管形瓶中的湿 / 干产品在水性稀释液中重构至少一种抗双整联蛋白抗体, 以形成溶液, 并且在 2-24 小时或更长的时间内使用该溶液的说明。对于单一管形瓶中的溶液产品, 该标签说明该溶液可以在 2-24 小时或更长的时间内使用。当前要求保护的产品可以用于人类药用产品用途。

[0181] 本发明的制剂可以通过以下方法制备, 包括混合至少一种抗双整联蛋白抗体和选定的缓冲液, 优选含有盐水或选定的盐的磷酸缓冲液。用常规溶解和混合步骤在水性缓冲液中混合至少一种抗体和缓冲剂。为了制备适当的制剂, 例如, 可以将测得量的溶于水或缓冲液中的至少一种抗体以足以提供所需浓度的蛋白和缓冲剂的量与所需缓冲剂在水中混合。本领域技术人员可以了解该方法的变化。例如, 加入各成分的顺序、是否使用其它添加剂、制备该制剂的温度和 pH 都是可以对使用的浓度和给药方式进行优化的因素。

[0182] 要求保护的稳定或储存的制剂可以以澄清的溶液或作为双管形瓶的形式提供给患者, 双管形瓶包含一个装有至少一种冷冷冻干燥的抗双整联蛋白抗体的管形瓶, 将其用含有水性稀释液的第二个管形瓶重构。单一溶液的管形瓶或要求重构的双管形瓶可以重复使用多次, 并且可以满足病人治疗的单个或多个周期, 因此比当前存在的方法提供更方便的治疗方案。

[0183] 可以根据本发明通过各种递送方法给予患者此处描述的至少一种抗双整联蛋白抗体的稳定或储存制剂或溶液; 所述方法包括皮下或肌内注射; 经皮、肺部、经粘膜、植入、渗透泵、药筒、微泵, 或其它本领域公知的本领域技术人员了解的方法。

[0184] 治疗用途

[0185] 本发明也提供了使用本发明的至少一种双整联蛋白抗体调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种本领域公知或此处描述的双整联蛋白相关疾病的方法。

[0186] 本发明也提供了一种调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种双整联蛋白相关疾病的方法, 所述疾病包括, 但不限于, 肥胖、免疫相关疾病、心血管疾病、感染性疾病、恶性疾病或神经疾病中的至少一种。

[0187] 本发明也提供了一种调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种免疫相关疾病的方法, 所述疾病包括, 但不限于, 以下疾病中的至少一种: 类风湿性关节炎、幼年类风湿性关节炎、全身发病的幼年类风湿性关节炎、牛皮癣关节炎、强制性脊柱炎、胃溃疡、血清阴性关节病、骨关节炎、炎性肠病、溃疡性结肠炎、系统性红斑狼疮、抗磷脂综合征、虹膜睫状体炎 / 葡萄膜炎 / 视神经炎、特发性肺纤维化、系统性血管炎 / wegener's 肉芽肿、肉样瘤病、睾丸炎 / 输精管切除逆转程序、过敏性 / 特应性疾病、哮喘、过敏性鼻炎、湿疹、过敏性接触性皮炎、过敏性结膜炎、过敏性肺炎、移植、器官移植排斥、移植抗宿主疾病、全身炎症反应综合征、脓毒症综合征、革兰氏阳性菌脓毒症、革兰氏阴性菌脓毒症、培养阴性菌脓毒症、真菌脓毒症、中性粒细胞减少性发热、尿脓毒症、脑膜炎球菌血症、创伤 / 出血、烧伤、离子辐射暴露、急性胰腺炎、成人呼吸窘迫综合征、类风湿性关节炎、酒精诱导的肝炎、慢性炎性病变、肉样瘤病、克隆氏病、镰状细胞贫血、糖尿病、肾病、特应性疾病、过敏反应、过敏性鼻炎、枯草热、终年性肺炎、结膜炎、子宫内膜异位、哮喘、风疹、全身过敏、皮炎、



恶性贫血、溶血性疾病、血小板减少症、任何器官或组织的移植排斥、肾移植排斥、心脏移植排斥、肝移植排斥、胰腺移植排斥、肺移植排斥、骨髓移植 (BMT) 排斥、皮肤同种异体移植排斥、软骨移植排斥、骨移植排斥、小肠移植排斥、胎儿胸腺移植排斥、甲状旁腺移植排斥、任何器官或组织的异种移植排斥、同种异体排斥、抗受体过敏反应、格雷夫斯病、雷诺氏病、B 型胰岛素抵抗糖尿病、哮喘、重症肌无力、抗体介导的细胞毒性、III 型过敏反应、系统性红斑狼疮、POEMS 综合征 (多发性神经病、器官巨大、内分泌病、单克隆  $\gamma$  球蛋白病和皮肤改变综合征)、多发性神经病、器官巨大、内分泌病、单克隆  $\gamma$  球蛋白病和皮肤改变综合征、抗磷脂综合征、天疱疮、硬皮病、混合性结缔组织病、特发性阿狄森氏病、糖尿病、慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、白癜风、血管炎、MI 心脏切开后综合征、IV 型过敏、接触性皮炎、过敏性肺炎、同种异体排斥、细胞内生物引起的肉芽肿、药物过敏、代谢性 / 特发性威尔逊氏病、血色素沉着病、 $\alpha$ -1-抗胰岛素缺陷、糖尿病肾病、桥本氏甲状腺炎、骨质疏松症、下丘脑-垂体-肾上腺轴评估、原发性胆汁性肝硬化、甲状腺炎、脑脊髓炎、恶液质、囊性纤维化、新生儿慢性肺疾病、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、家族性血巨噬细胞淋巴细胞组织细胞增多症、皮肤病学状况、牛皮癣、斑秃、肾病综合征、肾炎、肾小球肾炎、急性肾衰竭、血液透析、尿毒症、中毒、惊厥前状态、okt3 治疗、抗 cd3 治疗、细胞因子治疗、化疗、放疗 (如包括,但不限于 toaesthesia、贫血、恶液质等)、慢性水杨酸盐中毒等。见,例如 the Merck Manual, 12th-17th Editions, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., eds., Second Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000), 在此引入作为参考。

[0188] 本发明也提供了一种调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种心血管疾病的方法,所述疾病包括,但不限于,以下疾病中的至少一种:心脏性晕厥综合征、心肌梗塞、充血性心衰、卒中、缺血性卒中、出血、动脉硬化、动脉粥样硬化、再狭窄、糖尿病动脉硬化疾病、高血压、动脉性高血压、肾动脉性高血压、晕厥、休克、心血管系统梅毒、心衰、肺心病、原发性肺高血压、心律失常、心房异位搏动、心房扑动、心房纤颤 (持续或发作性)、灌注后综合征、心肺旁路炎症反应、混乱性或多灶性房性心动过速、规律性窄 QRS 心动过速、特异性心律失常、心室纤颤、希氏束心律失常、房室传导阻滞、束支传导阻滞、心肌缺血性紊乱、冠心病、心绞痛、心肌梗塞、心肌病、扩张性心肌病、限制性心肌病、瓣膜性心脏病、心内膜炎、心包疾病、心脏肿瘤、主动脉和外周动脉瘤、主动脉分割性动脉瘤、主动脉炎症、腹主动脉及其分支阻塞、外周血管病、阻塞性动脉疾病、外周动脉硬化性疾病、血栓性脉管炎、功能性外周动脉疾病、雷诺氏现象和疾病、手足发绀、红斑性肢痛病、静脉疾病、静脉血栓、静脉曲张、动静脉瘘、淋巴水肿、脂肪水肿、不稳定性心绞痛、再灌注损伤、泵后综合征、缺血再灌注损伤等。该方法任选包括,给予需要这种调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物、病人有效量的包含至少一种抗双整联蛋白抗体的组合物或药物组合物。

[0189] 本发明也提供了一种调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种感染疾病的方法,所述疾病包括,但不限于,以下疾病中的至少一种:急性和慢性细菌感染、急性和慢性寄生或感染过程,包括细菌、病毒和真菌感染、HIV 感染 / HIV 神经病、脑膜炎、肝炎 (甲型、乙型或丙型等)、脓毒性关节炎、腹膜炎、肺炎、会厌炎、大肠杆菌 0157:h7、溶血性尿毒症综合征 / 血栓溶解性血小板减少性紫癜、疟疾、登革热、利什曼病、麻风病、中毒性休克综合征、链球菌肌炎、气性坏疽、分支杆菌结核、分支杆菌 avium intracellulare、间质性浆

细胞肺炎、盆腔炎性疾病、睾丸酮 / 附睾炎、军团菌病、莱姆病、甲型流感、epstein-barr 病毒、生命体征相关的血巨噬细胞综合征、致命性脑炎 / 无菌性脑膜炎等。

[0190] 本发明也提供了一种调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种恶性疾病的方法,所述疾病包括,但不限于,以下疾病中的至少一种:白血病、急性白血病、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、B细胞、T细胞或FAB ALL、急性髓细胞性白血病(AML)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞白血病、骨髓发育不良综合征(MDS)、淋巴瘤、何杰金氏病、恶性淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、布加氏淋巴瘤、多发性硬化、卡波西肉瘤、结肠直肠癌、胰腺癌、鼻咽癌、恶性组织细胞增多症、副癌综合征 / 恶性高钙血症、实体瘤、腺癌、肉瘤、恶性黑素瘤、血管瘤、转移性疾病、癌相关骨重吸收、癌相关骨重吸收、癌相关骨痛等。

[0191] 本发明也提供了一种调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种神经疾病的方法,所述疾病包括,但不限于,以下疾病中的至少一种:神经退化性疾病、多发性硬化、偏头痛、AIDS 病痴呆合并症、脱髓鞘性疾病,如多发性硬化和急性横贯性脊髓炎;外锥体束和小脑疾病如皮质脊髓系统病变;基底节或小脑疾病;运动机能亢进疾病如亨廷顿氏舞蹈病和老年性舞蹈病;药物诱导的运动失调,如阻断 CNS 多巴胺受体的药物诱导的运动失调;运动机能减退疾病,如帕金森氏病;进展性核上性麻痹;小脑结构病变;脊髓小脑退化,如脊髓共济失调、Friedreich' s 共济失调、小脑皮质退化、多系统退化(Mencel, Dejerihe-Thomas, Shi Drager 和 Machado-Joseph);全身疾病(Refsum' s 病、A $\beta$  脂蛋白血症、共济失调、毛细血管扩张和线粒体多系统疾病);脱髓鞘核疾病,例如多发性硬化、急性横贯性脊髓炎;以及运动单位疾病,如神经原性肌萎缩(前角细胞退化,如肌萎缩性侧索硬化、婴儿脊肌萎缩和幼年脊肌萎缩);阿尔茨海默病;中年唐氏综合征;弥散性路易斯小体病;路易斯小体型老年痴呆;Wernicke-Korsakoff 综合征;慢性酒精中度;Creutzfeldt-Jakob 病;亚急性硬化性全脑炎、Hallerrorden-Spatz 病和 Dementia pugilistica 等。该方法任选包括,给予需要这种调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物、病人有效量的包含至少一种双整联蛋白抗体或其特定部分或变体的组合物或药物组合物。见,例如, the Merck Manual, 16<sup>th</sup> Edition, Merck & Company, Rahway, NJ(1992)。

[0192] 本发明的任何方法可以包括,给予需要这种调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物、病人有效量的包含至少一种抗双整联蛋白抗体的组合物或药物组合物。所述方法可以任选进一步包括用于治疗这些免疫疾病的共同给药或联合治疗,其中给予所述至少一种抗双整联蛋白抗体、其特定部分或变体,进一步包括在之前、同时和 / 或之后,给予至少一种选自下组的药物:至少一种 TNF 拮抗剂(例如,但不限于 TNF 抗体或片段、可溶性 TNF 受体或其片段、其融合蛋白、或小分子 TNF 拮抗剂)、抗风湿药物(如氨甲喋呤、金诺芬、金硫葡萄糖、硫唑嘌呤、etanercept、硫代苹果酸金钠、硫酸羟基氯喹、来氟米特、柳氮磺胺吡啶)、肌肉松弛剂、麻醉药、非甾体类抗炎药(NSAID)、镇痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂(如氨基糖苷、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、carbapenem、头孢菌素、flurorquinolone、大环内酯、青霉素、磺胺、四环素、其它抗微生物剂)、抗牛皮癣药物、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、糖尿病相关试剂、矿物质、营养剂、甲状腺制剂、维生素、钙相关激素、抗腹泻药、止咳药、抗呕吐药、抗溃疡药、通便药、抗凝剂、促红细胞生成素(如 epoetin  $\alpha$ )、菲尔司啟(如 G-CSF, Neupogen)、沙拉斯(GM-CSF, 白细胞素)、疫苗、免

疫球蛋白、免疫抑制剂（如 basiliximab、环孢霉素、daclizumab）、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、散瞳剂、睫状肌麻痹剂、烷化剂、抗代谢药、有丝分裂抑制剂、放射性药物、抗抑郁剂、抗精神病药物、抗躁狂药、抗精神病药物、抗焦虑药、催眠药、拟交感神经药物、刺激剂、donepezil、他克林、抗哮喘药、 $\beta$  激动剂、吸入性类固醇、白三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、9-氨基四氢吡啶、肾上腺素或类似物、 $\alpha$  链道酶 (Pulmozyme)、细胞因子或细胞因子拮抗剂。细胞因子的非限制性实例包括，但不限于 IL-1 至 IL-23 中的任意一种。适当的剂量是本领域公知的。见，例如，Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000) ; PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), 在此全文引入作为参考。

[0193] 适用于本发明的组合物、联合治疗、共同给药、设备和 / 或方法的 TNF 拮抗剂（进一步包括本发明的至少一种抗体、其特定片段和变体）包括，但不限于，抗 TNF 抗体、其抗原结合片段、以及与 TNF 特异性结合的受体分子；防止和 / 或抑制 TNF 合成、TNF 释放或 TNF 作用于靶细胞的化合物，如酰胺哌啶酮、替尼达普、磷酸二酯酶抑制剂（如己酮可可碱、环戊苯吡酮）、A2b 腺苷受体激动剂和 A2b 腺苷受体增强剂；防止和 / 或抑制 TNF 受体信号传递的化合物，如有丝分裂原激活的蛋白 (MAP) 激酶抑制剂；阻断和 / 或抑制膜 TNF 裂解的化合物，如金属蛋白酶抑制剂；阻断和 / 或抑制 TNF 活性的化合物，如血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制剂（如卡托普利）；和阻断和 / 或抑制 TNF 活性产生和 / 或合成的化合物，如 MAP 激酶抑制剂。

[0194] 这里用到的“肿瘤坏死因子抗体”、“TNF 抗体”、“TNF  $\alpha$  抗体”或片段等在体外、原位和 / 或优选体内减少、阻断、抑制、消除或干扰 TNF  $\alpha$  活性。例如，本发明的适当 TNF 人抗体可以结合 TNF  $\alpha$  并且包括特异性与 TNF  $\alpha$  结合的抗 TNF 抗体、其抗原结合片段、及其特定突变体或结构域。适当的 TNF 抗体或片段也可以减少、阻断、抑制、消除、干扰、防止和 / 或抑制 TNF RNA、DNA 或蛋白合成、TNF 释放、TNF 受体信号传递、膜 TNF 裂解、TNF 活性、TNF 产生和 / 或合成。

[0195] 嵌合抗体 cA2 由称作 A2 的高亲和性中和性小鼠抗人 TNF  $\alpha$  IgG1 抗体的抗原结合可变区和人 IgG1  $\kappa$  免疫球蛋白的恒定区组成。人 IgG1Fc 区改进同种异体基因抗体效应功能，增加血清循环半衰期和减少抗体的免疫原性。嵌合抗体 cA2 的亲力和表位特异性来源于鼠抗体 A2 的可变区。在特定实施方案中，编码鼠抗体 A2 可变区的核酸的优选来源是 A2 杂交瘤细胞系。

[0196] 嵌合 A2 (cA2) 以剂量依赖性方式中和天然和重组人 TNF  $\alpha$  的细胞毒作用。从嵌合抗体 cA2 和重组人 TNF  $\alpha$  的结合测定可以计算出，嵌合抗体 cA2 的亲合常数为  $1.04 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ 。通过竞争性抑制测定单克隆抗体特异性和亲和性的优选方法可以参见，Harlow, et al., *antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988 ; Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, New York, (1992-2000) ; Kozbor et al., *linintinol Today*, 4 : 72-79 (1983) ; Ausubel et al., eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York (1987-2000) ; 和 Muller, *Meth. Enzymol.*, 92 : 589-601 (1983), 在此全文引入每一篇作为参考。

[0197] 在特定实施方案中,鼠单克隆抗体由称作 c 134A 的细胞系产生。嵌合抗体 cA2 由称作 c 168A 的细胞系产生。

[0198] 其它可以用于本发明的单克隆抗 TNF 抗体的例子在本领域中有描述(见,例如,美国专利 No. 5,231,024;Moller, A. et al., Cytokine 2(3):162-169(1990);美国申请 No. 07/943,852(1992年9月11日提交);Rathjen et al.,国际公开 No. WO 91/02078(1991年2月11日公开);Rubin et al.,欧洲专利申请 No. 0218868(1987年4月22日公开);Yone et al.,欧洲专利申请 No. 0288088(1988年10月26日);Liang, et al., Biochem. Biophys. Res. Com. 137:847-854(1986);Meager, et al., Hybridoma 6:305-311(1987);Fendly et al., Hybridoma 6:359-369(1987);Bringman, et al., Hybridoma 6:489-507(1987);和 Hirai, et al., J. Immunol. Meth. 96:57-62(1987),在此全文引入作为参考。

[0199] TNF 受体分子

[0200] 用于本发明的优选 TNF 受体分子是以高亲和性与 TNF  $\alpha$  结合(见,例如 Feldmann et al.,国际公开 No. WO 92/07076(1992年4月30日公开);Schall et al., Cell 61:361-370(1990);和 Loetscher et al., Cell 61:351-359(1990),在此全文引入作为参考)并且任选具有低免疫原性的受体。具体地,55kDa(p55 TNF-R)和 75kDa(p75TNF-R)TNF 细胞表面受体可以用于本发明。这些受体的截短形式,包括受体的细胞外结构域(ECD)或其功能部分(见,例如 Corcoran et al., Emir. J. Biochem. 223:831-840(1994))也可以用于本发明。已经在尿和血清中检测到了作为 30kDa 和 40kDa 的 TNF  $\alpha$  抑制性结合蛋白的截短形式的 TNF 受体,其中包含 ECD(Engelmann, H. et al., J. Biol. Chem. 265:1531-1536(1990))。TNF 受体多聚分子和 TNF 免疫受体融合分子,及其衍生物和片段或部分是本发明的方法和组合物中可以使用的 TNF 受体分子的其它例子。可以用于本发明的 TNF 受体分子的特征在于可以在延长的时间中治疗患者,具有良好至极佳的症状缓解作用,以及低毒性。低免疫原性和/或高亲和性,以及其它未确定的特性,都可以对达到治疗结果起作用。

[0201] 用于本发明的 TNF 受体多聚分子包含两种或多种 TNF 受体的 ECD 的所有或功能性部分,它们通过一种或多种多肽接头或其它非肽接头,例如聚乙二醇(PEG)连接。多聚分子可以进一步包含指导多聚分子表达的被分泌蛋白的信号肽。这些多聚分子和产生它们的方法描述于美国申请 No. 08/437,533(1995年5月9日提交),在此引入其完整内容作用参考。

[0202] 用于本发明的方法和组合物中的 TNF 免疫受体融合分子包含一种或多种免疫球蛋白分子的至少一部分和一种或多种 TNF 受体的全部或功能性部分。这些免疫受体融合分子可以组装为单体、或异或同多聚体。免疫受体融合分子也可以是单价或多价的。这种 TNF 免疫受体融合分子的一个例子是 TNF 受体/IgG 融合蛋白。TNF 免疫受体融合分子和产生它们的方法在本领域中已有描述(Lesslerauer et al., Eur. J. Immunol. 21:2883-2886(1991);Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539(1991);Peppel et al., J. Exp. Med. 174:1483-1489(1991);Kolls et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219(1994);Butler et al., Cytokine 6(6):616-623(1994);Baker et al., Eur. J. Immunol. 24:2040-2048(1994);Beutler et al., 美国专利 No. 5,447,851;和美国申请 No. 08/442,133(1995年5月16日提交),在此全文引入每一篇作为参考)。产生免疫受体融合分子的方法也参见 Caponet et al., 美国专利 No. 5,116,964;Capon et al., 美国专利 No. 5,225,538;和 Capon et al., Nature 337:525-531(1989),在此全文引入作为参考。

[0203] TNF 受体的功能等价物、衍生物、片段或区域是指 TNF 受体分子的部分,或编码 TNF 受体分子的 TNF 受体分子序列的部分,它们的大小和序列足以在功能上类似于可以用于本发明的 TNF 受体分子(如,以高亲和性结合 TNF $\alpha$  并且具有低免疫原性)。TNF 受体分子的功能等价物也包括修饰的 TNF 受体分子——该分子在功能上类似于可以用于本发明的 TNF 受体分子(如,以高亲和性结合 TNF $\alpha$  并且具有低免疫原性)。例如, TNF 受体分子的功能等价物可以包含“沉默”密码子或一种或多种氨基酸取代、去除或添加(如用一种氨基酸取代另一种氨基酸;或用编码相同或不同疏水性氨基酸的密码子取代另一种编码疏水性氨基酸的密码子)。参见, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, GreenePublishing Assoc. and Wiley-Interscience, New York(1987-2000)。

[0204] 细胞因子包括任何已知的细胞因子。见,例如 CopewithCytokines.com。细胞因子拮抗剂包括,但不限于,任何抗体、其片段或模拟物、任何可溶性受体、其片段或模拟物、任何小分子拮抗剂或任何其组合。

[0205] 治疗处理。本发明的任何方法可以包括治疗双整联蛋白介导的疾病,包括给予需要这种调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物、病人有效量的包含至少一种双整联蛋白抗体的组合物或药物组合物。所述方法可以任选进一步包括用于治疗这些免疫疾病的共同给药或联合治疗,其中给予所述至少一种抗 TNF 抗体、其特定部分或变体,进一步包括在之前、同时和 / 或之后,给予至少一种选自下组的药物:至少一种 TNF 拮抗剂(例如,但不限于 TNF 抗体或片段、可溶性 TNF 受体或其片段、其融合蛋白、或小分子 TNF 拮抗剂)、抗风湿药物(如氨甲喋呤、金诺芬、金硫葡萄糖、硫唑嘌呤、etanercept、硫代苹果酸金钠、硫酸羟基氯喹、来氟米特、柳氮磺胺吡啶)、肌肉松弛剂、麻醉药、非甾体类抗炎药(NSAID)、镇痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂(如氨基糖苷、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、carbapenem、头孢菌素、flurorquinolone、大环内酯、青霉素、磺胺、四环素、其它抗微生物剂)、抗牛皮癣药物、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、糖尿病相关试剂、矿物质、营养剂、甲状腺制剂、维生素、钙相关激素、抗腹泻药、止咳药、抗呕吐药、抗溃疡药、通便药、抗凝剂、促红细胞生成素(如 epoetin $\alpha$ )、非尔司啉(如 G-CSF, Neupogen)、沙拉斯(GM-CSF, 白细胞素)、疫苗、免疫球蛋白、免疫抑制剂(如 basiliximab、环孢霉素、daclizumab)、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、散瞳剂、睫状肌麻痹剂、烷化剂、抗代谢药、有丝分裂抑制剂、放射性药物、抗抑郁剂、抗精神病药物、抗躁狂药、抗精神病药物、抗焦虑药、催眠药、拟交感神经药物、刺激剂、donepezil、他克林、抗哮喘药、 $\beta$  激动剂、吸入性类固醇、白三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、9-氨基四氢吡啶、肾上腺素或类似物、 $\alpha$  链道酶(Pulmozyme)、细胞因子或细胞因子拮抗剂。

[0206] 一般地,病理学状况的治疗是通过给予有效量或剂量的至少一种抗双整联蛋白抗体组合物而实现的,该组合物中平均总共含有至少约 0.01-500mg 至少一种抗双整联蛋白抗体 / 千克患者体重 / 剂,优选每单次或多次给药约 0.01-100mg 抗体 / 千克患者体重,这取决于组合物中含有的比活性。作为选择,有效血清浓度可以包括每单次或多次给药 0.1-5000  $\mu$ g/ml 的血清浓度。适当的剂量是医学从业者已知的,当然,取决于特定的疾病状态、给予的组合物的比活性、以及患者正在进行的具体治疗。在一些情况下,为获得需要的治疗量,必须提供重复给药,即重复特定监测或计量剂量的各次给药,其中重复各次给药,直到达到需要的每日剂量或效果。

[0207] 优选的剂量可以任选包括 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、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、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 和 / 或 100-500mg/kg/ 给药, 或其中的任意范围、任意值或任意分数, 或每单次或多次给药达到 0.1、0.5、0.9、1.0、1.1、1.2、1.5、1.9、2.0、2.5、2.9、3.0、3.5、3.9、4.0、4.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、20、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14.0、14.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、12、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14、14.5、15、15.5、15.9、16、16.5、16.9、17、17.5、17.9、18、18.5、18.9、19、19.5、19.9、20、20.5、20.9、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、96、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、和 / 或 5000  $\mu$ g/ml 血清浓度, 或其中的任意范围、任意值或任意分数。

[0208] 此外, 给药剂量可以根据已知因素而改变, 例如具体试剂的药代动力学特征, 以及其给药模式和途径; 接受者的年龄、健康和体重; 症状的性质和范围; 同时进行的治疗的类型、频率, 以及需要的效果。活性成分的剂量通常为约 0.1-100mg/kg 体重。通常为 0.1-50, 优选 0.1-10mg/kg/ 给药, 或以有效获得需要的结果的持续释放形式。

[0209] 作为非限制性实例, 人或动物的治疗可以通过一次或周期剂量的至少一种本发明的抗体而提供, 其剂量为 0.1-100mg/kg, 例如 0.5、0.9、1.0、1.1、1.5、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、40、45、50、60、70、80、90 或 100mg/kg/ 日, 在第 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、36、37、38、39、或 40 天中的至少一天给药, 或作为选择或额外地在第 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、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、或 52 周的至少一周给药, 或作为选择或额外地在 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 年中的至少一年中给药, 或其任意组合, 采用单次输注或重复给药。

[0210] 适于内部给药的剂型 (组合物) 一般包含约 0.1mg- 约 500mg 活性成分 / 单位或容器。在这些药物组合物中, 活性成分的量一般为组合物总重量的约 0.5-99.999wt%。

[0211] 对于肠胃外给药, 可以将抗体配制为与药学可接受的肠胃外载体结合或分别提供的溶液、悬浮液、乳状液或冷冷冻干燥的粉末。这些载体的例子为水、盐水、林格氏液、右旋糖溶液、和 1-10% 的人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性载体如固定的油。载体或冷冻干燥的粉末可以含有维持等渗性 (如氯化钠、甘露醇) 和化学稳定性 (如缓冲剂和防腐剂)。该制剂可以通过已知或适当技术灭菌。

[0212] 适当的药物载体描述于本领域的标准参考文献 Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol 的最新版本。

[0213] 作为选择的给药

[0214] 可以根据本发明采用许多公知的和开发的方式给予药学有效量的本发明的至少

一种抗双整联蛋白抗体,尽管在以下说明书中使用了肺部给药,根据本发明可以使用其它给药方式,得到适当的结果。

[0215] 本发明的双整联蛋白抗体在载体中递送,作为溶液、乳状液、胶体或悬浮液、或作为干粉递送,采用适于通过此处描述的或本领域公知的吸入或其它方式进行给药的任何设备和方法。

[0216] 肠胃外制剂和给药

[0217] 肠胃外给药的制剂可以包含作为常规赋形剂的无菌水或盐水、聚链烷醇如聚乙二醇、植物油、氢化萘等。可以通过适当的乳化剂或润湿剂和悬浮剂根据已知方法制备用于注射的水性或油性悬浮液。用于注射的试剂可以是无毒的、非口服给药的稀释剂,如水溶液或无菌可注射溶液或溶剂中的悬浮液。作为可使用的载体或溶剂,可以使用水、林格氏液、等渗盐水等;作为普通溶剂或悬浮溶剂,可以使用无菌的不挥发油。对于这些目的,可以使用任意类型的不挥发油和脂肪酸,包括天然或合成的或半合成的脂肪油或脂肪酸;天然或合成的或半合成的甘油单酯或二酯或三酯。肠胃外给药是本领域公知的,包括,但不限于,常规注射工具、描述于美国专利 No. 5, 851, 198 的气加压的无针头注射设备,和描述于美国专利 No. 5, 839, 446 的激光穿孔器设备,在此全文引入上述专利作为参考。

[0218] 作为选择的递送

[0219] 本发明进一步涉及通过肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、盆腔内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、快速注射、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内或经皮设备而给予至少一种抗双整联蛋白抗体。可以制备至少一种抗双整联蛋白抗体的组合物,用于肠胃外(皮下、肌内或静脉内)或任意其它给药,特别是以液体溶液或悬浮液给药;用于阴道或直肠给药,特别是以半固体形式给药,例如,但不限于以霜和栓剂形式给药;用于颊部或舌下给药,例如,但不限于以片剂或胶囊形式给药;或用于鼻内给药,例如,但不限于以粉末、鼻滴液或气溶胶或某些制剂形式给药;或用于经皮给药,例如,但不限于以凝胶、油膏、洗液、悬浮液或贴剂递送系统给药,同时用化学增强剂如二甲基亚砷修饰皮肤结构或增加经皮贴剂的药物浓度(Junginger, et al. In "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., Eds., pp. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994,) 在此全文引入作为参考),或使用氧化剂以便将含有蛋白和肽的制剂应用于皮肤上(WO 98/53847),或施加电场以便产生电穿孔等瞬时转运途径,或增加带电药物通过皮肤的迁移率,如离子电渗疗法,或应用超声,如超声电渗疗法(美国专利 Nos. 4, 309, 989 和 4, 767, 402)(上述文献和专利在此全文引入作为参考)。

[0220] 肺部/鼻部给药

[0221] 对于肺部给药,至少一种抗双整联蛋白抗体组合物优选以优选到达肺的下气道或鼻窦的颗粒大小进行递送。根据本发明,至少一种抗双整联蛋白抗体可以通过本领域公知的各种吸入或鼻设备递送,用于通过吸入进行治疗剂的给药。这些设备可以将气溶胶化的制剂沉积在患者的鼻窦腔或肺泡中,所述设备包括计量吸入器、喷洒器、干粉产生器、喷雾器等。其它适于指导抗体的肺或鼻给药的设备是本领域公知的。所有这些设备可以使用适于以气溶胶形式给予分散抗体的制剂。这些气溶胶可以由溶液(水性和非水性)或固

体颗粒组成。**Ventolin**<sup>®</sup>等计量吸入器一般使用推进气体并且在吸入时要求激活（见，例如 WO 94/16970, W098/35888）。由 Inhale Therapeutics 出售的 Turbuhaler<sup>™</sup>(Astra)、**Rotahaler**<sup>®</sup> (Glaxo)、**Diskus**<sup>®</sup> (Glaxo)、Spiros<sup>™</sup>吸入器 (Dura) 等干粉吸入器以及 **Spinhaler**<sup>®</sup>粉末吸入器使用呼吸激活的混合粉末 (US 4668218Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, US5458135 Inhale, WO 94/06498 Fisons, 在此全文引入作为参考)。AERx<sup>™</sup>Aradigm、**Ultravent**<sup>®</sup>喷洒器 (Mallinckrodt) 和 Acorn **II**<sup>®</sup>喷洒器 (Marquest Medical Products) ((US 5404871 Aradigm, WO 97/22376), 上述参考文献在此全文引入作为参考) 从溶液产生气溶胶, 而计量吸入器、干粉吸入器等产生小颗粒气溶胶。这些商购吸入设备的具体例子是用于代表适于本发明的实施的具体设备, 不准备限制本发明的范围。包含至少一种抗双整联蛋白抗体的组合物优选通过干粉吸入器或喷雾器递送。用于本发明的至少一种抗体的给药的吸入设备具有一些需要的特征。例如, 通过吸入设备递送是有利的, 它可靠、可重复并且准确。吸入设备可以任选递送小的干颗粒, 例如小于约 10  $\mu$  m, 优选约 1-5  $\mu$  m, 以便能够较好地呼吸。

[0222] 作为喷雾给予双整联蛋白抗体组合物

[0223] 可以迫使至少一种抗双整联蛋白抗体的悬浮液和溶液在压力下通过喷嘴, 从而产生包括双整联蛋白抗体组合物的喷雾。可以选择喷嘴大小和构型、施加的压力和填入液体的速度而达到需要的输出量和颗粒大小。可以通过连接于毛细管或喷嘴的电场产生电喷雾。有利的是, 由喷雾递送的至少一种抗双整联蛋白抗体组合物蛋白的颗粒大小小于约 10  $\mu$  m, 优选约 1-5  $\mu$  m, 最优选约 2-3  $\mu$  m。

[0224] 适用于喷雾器的至少一种抗双整联蛋白抗体组合物蛋白的制剂一般包含溶于水溶液中的抗体组合物蛋白, 其浓度为约每毫升溶液约 0.1-100mg 至少一种抗双整联蛋白抗体组合物蛋白或 mg/gm, 或其中的任意范围或任意值, 例如, 但不限于 1、. 2、. 3、. 4、. 5、. 6、. 7、. 8、. 9、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、40、45、50、60、70、80、90 或 100mg/ml 或 mg/gm。该制剂可以包含赋形剂、缓冲剂、等渗试剂、防腐剂、表面活性剂和优选锌等试剂。该制剂也可以包含赋形剂或用于稳定组合物蛋白的试剂, 例如缓冲剂、还原剂、大分子蛋白或碳水化合物。用于配制抗体组合物蛋白的大分子蛋白包括白蛋白、鱼精蛋白等。用于配制抗体组合物蛋白的典型碳水化合物包括蔗糖、甘露醇、乳糖、海藻糖、葡萄糖等。抗体组合物蛋白制剂也可以包含表面活性剂, 它可以减少或防止由于溶液形成气溶胶时的雾化导致的表面诱导的抗体组合物蛋白的聚集。可以使用各种常规的表面活性剂, 例如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇, 以及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯。其含量一般为制剂重量的约 0.001-14%。用于本发明的特别优选的表面活性剂为聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨糖醇酯 80、聚山梨糖醇酯 20 等。用于双整联蛋白抗体或其特定部分或变体的蛋白制剂的其它试剂是本领域公知的, 也可以包含在制剂中。

[0225] 通过喷洒器给予双整联蛋白抗体组合物

[0226] 可以通过喷洒器给予抗体组合物, 例如喷射喷洒器或超声喷洒器。一般地, 在喷射喷洒器中, 用压缩气体源通过一个孔而产生高速气体喷射。当其它膨胀超过喷嘴时, 产生低压区, 该区将抗体组合物蛋白溶液拉拽通过与液体储存器连接的毛细管。通过毛细管的液体流出管时被剪切成不稳定的细丝和微滴, 产生气溶胶。可以使用各种构型、流速和挡板类



型一般从给定的喷射喷洒去达到需要的性能特征。在超声喷洒器中,采用高频电能产生振动、机械能,一般采用压电式换能器。该能量被直接或通过耦合流体转移至抗体组合物制剂,产生包含抗体组合物蛋白的气溶胶。有利地,由喷洒器递送的抗体组合物蛋白的颗粒大小小于约  $10\ \mu\text{m}$ , 优选约  $1\text{--}5\ \mu\text{m}$ , 最优选约  $2\text{--}3\ \mu\text{m}$ 。

[0227] 喷射喷洒器或超声喷洒器中适用的至少一种抗双整联蛋白抗体制剂的浓度一般为每毫升溶液约  $0.1\text{--}100\text{mg}$  至少一种抗双整联蛋白抗体蛋白。该制剂可以包含赋形剂、缓冲剂、等渗试剂、防腐剂、表面活性剂和优选锌等试剂。该制剂也可以包含赋形剂或用于稳定至少一种抗双整联蛋白抗体组合物蛋白的试剂,例如缓冲剂、还原剂、大分子蛋白或碳水化合物。用于配制至少一种抗双整联蛋白抗体的大分子蛋白包括白蛋白、鱼精蛋白等。用于配制至少一种抗双整联蛋白抗体的典型碳水化合物包括蔗糖、甘露醇、乳糖、海藻糖、葡萄糖等。至少一种抗双整联蛋白抗体制剂也可以包含表面活性剂,它可以减少或防止由于溶液形成气溶胶时的雾化导致的表面诱导的至少一种抗双整联蛋白抗体的聚集。可以使用各种常规的表面活性剂,例如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇,以及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯。其含量一般为制剂重量的约  $0.001\text{--}4\%$ 。用于本发明的特别优选的表面活性剂为聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨糖醇酯 80、聚山梨糖醇酯 20 等。用于抗体蛋白等蛋白制剂的其它试剂是本领域公知的,也可以包含在制剂中。

[0228] 通过计量吸入器给予双整联蛋白抗体组合物

[0229] 在计量吸入器 (MDI) 中,在一个小罐中装有作为包含液化的压缩气体的混合物的推进剂、至少一种抗双整联蛋白抗体和任意赋形剂或其它添加剂。计量阀的激活释放作为气溶胶的混合物,优选含有大小小于约  $10\ \mu\text{m}$ , 优选约  $1\text{--}5\ \mu\text{m}$ , 最优选约  $2\text{--}3\ \mu\text{m}$  的。需要的气溶胶颗粒大小可以通过使用由本领域技术人员公知的各种方法,包括喷射研磨、喷雾干燥、临界点浓缩等方法产生的抗体组合物蛋白制剂而获得。优选的计量吸入器包括由 3M 或 Glaxo 制造并且使用氢氟碳推进剂的那些。

[0230] 计量吸入器设备中使用的至少一种抗双整联蛋白抗体一般包含精细分割的粉末,其中含有作为非水介质中的悬浮物的至少一种抗双整联蛋白抗体,例如,在表面活性剂的帮助下悬浮于一种推进剂中。用于此目的的推进剂可以是任何常规材料,如氯氟碳、氢氯氟碳、氢氟碳或烃,包括三氯氟甲烷、二氯二氟甲烷、二氯四氟乙醇和 1,1,1,2-四氟乙烷、IFA-134a (氢氟链烷 -134a)、HFA-227 (氢氟链烷 -227) 等。推进剂优选是氢氟碳。可以选择表面活性剂以稳定作为推进剂中的悬浮物的至少一种抗双整联蛋白抗体,从而保护活性试剂免受化学降解等。适当的表面活性剂包括山梨糖醇三油酸酯、大豆卵磷脂、油酸等。在一些情况下,溶液气溶胶优选使用乙醇等溶剂。本领域已知的用于蛋白制剂的其它试剂,如蛋白,也可以包含在制剂中。

[0231] 本领域的普通技术人员将认识到,本发明的方法可以通过此处没有描述的设备对至少一种抗双整联蛋白抗体组合物进行肺部给药而达到。

[0232] 口服制剂和给药

[0233] 口服制剂依赖于佐剂 (如间苯二酚和非离子型表面活性剂如聚氧乙烯油酯和正十六烷基聚乙烯酯) 的共同给药而人工增加肠壁的通透性,并且依赖于酶抑制剂 (如胰蛋白酶抑制剂、二异丙基氟代硫酸酯 (DFF) 和抑肽酶) 的共同给药而抑制酶促降解。用于口服给药的固态剂型的活性组成化合物可以与至少一种添加剂混合,所述添加剂包括蔗糖、乳

糖、纤维素、甘露醇、海藻糖、棉籽糖、麦芽糖醇、右旋糖苷、淀粉、琼脂、arginates、几丁质、脱乙酰壳聚糖、果胶、黄芪树胶、阿拉伯树胶、明胶、胶原、酪蛋白、白蛋白、合成或半合成聚合物和甘油酯。这些剂型也可以包含其它类型的添加剂,如非活性稀释剂、润滑剂如硬脂酸镁、对羟基苯甲酸酯、防腐剂如山梨酸、抗坏血酸、 $\alpha$  生育酚、抗氧化剂如半胱氨酸、崩解剂、粘合剂、增稠剂、缓冲剂、增甜剂、矫味剂、芳香剂等。

[0234] 片剂和丸剂可以进一步加工成肠衣制剂。用于口服给药的液体制剂包括允许医学应用的乳状液、糖浆、酞剂、悬浮液和溶液制剂。这些制剂可以含有所述领域常用的非活性稀释剂,如水。也已经描述将脂质体用作胰岛素和肝素的药物递送系统(美国专利 No. 4, 239, 754)。最近,已经使用混合氨基酸(类蛋白)的人工聚合物微球体来递送药物(美国专利 No. 4, 925, 673)。此外,美国专利 No. 5, 879, 681 和美国专利 No. 5, 5, 871, 753 中描述的载体化合物也已经用于口服递送生物活性试剂,这是本领域公知的。

#### [0235] 粘膜制剂和给药

[0236] 对于通过粘膜表面吸收,给予至少一种抗双整联蛋白抗体的组合物和方法包括含有多种亚微米颗粒、粘膜吸附性大分子、生物活性肽和水性连续相的乳状液,它通过达到乳状液颗粒的粘膜吸附而促进通过粘膜表面的吸收(美国专利 Nos. 5, 514, 670)。适于施加本发明的乳状液的粘膜表面可以包括角膜、结膜、颊、舌下、鼻、阴道、肺、胃、肠和直肠给药途径。用于阴道或直肠给药的制剂,如栓剂,可以包含赋形剂,例如聚链烷醇、凡士林、可可油等。用于鼻内给药的制剂可以是固体,包含赋形剂,例如乳糖,或可以是水性或油性的鼻滴液。对于颊部给药,赋形剂包括糖、硬脂酸钙、硬脂酸镁、预胶化淀粉等(美国专利 Nos. 5, 849, 695)。

#### [0237] 经皮制剂和给药

[0238] 对于经皮给药,将至少一种抗双整联蛋白抗体包被于递送载体,如脂质体或聚合纳米颗粒、微颗粒、微胶囊或微球体中(除非特别指出,统一称作微颗粒)。已知有许多适当的设备,包括由以下成分组成的微颗粒:合成聚合物如多羟基酸,如聚乳酸、聚乙醇酸及其共聚物、聚原酸酯、聚酞和聚磷腈,以及天然聚合物如胶原、聚氨基酸、铝和其它蛋白、藻酸盐和其它多糖、及其组合(美国专利 Nos. 5, 814, 599)。

#### [0239] 延长的给药和制剂

[0240] 有时可能需要在延长的时间内向受试者递送本发明的化合物,例如,单次给药在一周至一年的时间。可以使用各种缓释、储存或植入剂型。例如,该剂型可以包含化合物的药学可接受的无毒盐,该化合物在体液中具有低溶解度,例如,(a) 多价酸的酸加成盐,所述酸例如磷酸、硫酸、柠檬酸、酒石酸、鞣酸、pamoic 酸、藻酸、聚谷氨酸、萘单或二磺酸、聚半乳糖醛酸等;多价金属阳离子的盐,所述阳离子如锌、钙、铋、钡、镁、铝、铜、钴、镍、镉等,或与有机阳离子如 N,N' - 二苄基 - 乙二胺或乙二胺形成的盐;或 (c), (a) 和 (b) 的组合物,如鞣酸锌。此外,本发明的化合物或优选相对不溶的盐,如前面描述的化合物和盐,可以与芝麻油等适于注射的物质一起配制于单硬脂酸铝凝胶等凝胶中。特别优选的盐是锌盐、鞣酸锌盐、pamoate 盐等。用于注射的缓释储存制剂的另一种类型包含用于包被于胶囊中的分散的化合物或盐,所述化合物或盐位于缓慢降解、无毒、非抗原性的聚合物中,如描述于美国专利 No. 3, 773, 919 的聚乳酸 / 聚乙醇酸聚合物。该化合物或优选相对不溶的盐,如前面描述的化合物和盐,也可以配制于胆固醇基质硅橡胶丸,特别是用于动物。其它缓释、储存或

植入制剂,如气体或液体脂质体是本领域公知的(美国专利Nos. 5,770,222和" Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J.R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1978)。

[0241] 前面已经一般性地描述了本发明,参考以下实施例可以更容易理解本发明,实施例是用于举例说明,而不是限制性的。

[0242] 实施例 1:在哺乳动物细胞中克隆和表达双整联蛋白抗体

[0243] 典型的哺乳动物表达载体含有至少一种启动子元件,它介导 mRNA、抗体编码序列以及转录终止和转录物的聚腺苷酸化所需信号的转录起始。其它元件包括增强子、Kozak 序列和间插序列,其侧翼具有 RNA 剪接的供体和受体位点。可以通过 SV40 的早期和晚期启动子、逆转录病毒的长末端重复 (LTRS),如 SV, HTLVI, HIVI 和巨细胞病毒 (CMV) 的早期启动子完成高度有效的转录。然而,也可以使用细胞元件(如人肌动蛋白启动子)。用于实施本发明的适当表达载体包括,例如, pIRES1neo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN 或 pLNCX(Clontech Labs, Palo Alto, CA), pcDNA3.1(+/-), pcDNA/Zeo(+/-) 或 pcDNA3.1/Hygro(+/-) (Invitrogen), PSVL 和 PMSG (Pharmacia, Uppsala, Sweden), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) 和 pBC12MI (ATCC 67109) 等载体。可以使用的哺乳动物宿主细胞包括人 HeLa 293, H9 和 Jurkat 细胞,小鼠 NIH3T3 和 C127 细胞, Cos 1, Cos 7 和 CV 1, 鹤鹑 QC1-3 细胞,小鼠 L 细胞和中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

[0244] 作为选择,可以在含有整合到染色体中的基因的的稳定细胞系中表达基因。用 dhfr, gpt, 新霉素或潮霉素等选择性标记共转染,可以鉴定和分离被转染的细胞。

[0245] 也可以扩增经转染的基因,使其表达大量被编码的抗体。用 DHFR(二氢叶酸还原酶)标记开发携带几百或甚至几千拷贝目的基因的细胞系。另一种有用的选择标记是谷氨酰胺合成酶 (GS) (Murphy, et al., Biochem. J. 227:277-279(1991); Bebbington, et al., Bio/Technology 10:169-175(1992))。采用这些标记,在选择性培养基中培养哺乳动物细胞,选择具有最高抗性的细胞。这些细胞系含有整合到染色体中的被扩增的基因。通常用中国仓鼠卵巢 (CHO) 和 NS0 细胞产生抗体。

[0246] 表达载体 pC1 和 pC4 含有劳斯肉瘤病毒强启动子 (LTR) (Cullen, et al., Molec. Cell. Biol. 5:438-447(1985)) 和 CMV 增强子的片段 (Boshart, et al., Cell 41:521-530(1985))。多个克隆位点,如具有限制酶裂解位点 BamHI, XbaI 和 Asp718 的那些,促进了目的基因的克隆。这些载体除 3' 内含子外,还含有大鼠前胰岛素原基因的聚腺苷酸化和终止信号。

[0247] 在 CHO 细胞中克隆和表达

[0248] 用载体 pC4 表达双整联蛋白抗体表达。质粒 pC4 是质粒 pSV2-dhfr (ATCC 保藏号 No. 37146) 的衍生物。该质粒含有 SV40 早期启动子控制下的小鼠 DHFR 基因。可以通过在选择性培养基(如  $\alpha$ -MEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD) 中培养细胞而选择用这些质粒转染的中国仓鼠卵巢细胞或其它缺乏二氢叶酸活性的细胞,该培养基中补加了化疗剂氨甲喋呤。抗氨甲喋呤 (MTX) 的细胞中的 DHFR 基因的扩增已经有记载(见,例如 F. W. Alt, et al., J. Biol. Chem. 253:1357-1370(1978); J. L. Hamlin and C. Ma, Biochem. et Biophys. Acta 1097:107-143(1990); 和 M. J. Page and M. A. Sydenham, Biotechnology 9:64-68(1991))。在不断增加的 MTX 浓度下培养的细胞通过靶酶 DHFR 的过量产生发生了对

药物的抗性,这是因为 DHFR 基因的扩增。如果将第二种基因连接于 DHFR 基因,它通常被共扩增并且过度表达。本领域公知该方法可以用于开发携带多于 1000 拷贝的被扩增基因的细胞系。因此,当撤去氨甲喋呤时,获得了含有整合到宿主细胞的一个或多个染色体的被扩增基因。

[0249] 质粒 pC4 含有用于表达目的基因的劳斯肉瘤病毒长末端重复 (LTR) 的强启动子 (Cullen, et al., *Molec. Cell. Biol.* 5:438-447(1985)) 和从人巨细胞病毒 (CMV) 的立即早期基因的增强子分离的片段 (Boshart, et al., *Cell* 41:521-530(1985))。启动子下游是允许基因整合的 BamHI, XbaI, 和 Asp718 限制酶裂解位点。该质粒在这些克隆位点之后含有 3' 内含子和大鼠前胰岛素原基因的聚腺苷酸化位点。其它高效启动子也可以用于表达,例如人  $\beta$  肌动蛋白启动子、SV40 早期或晚期启动子或来自于其它逆转录病毒,如 HIV 和 HTLVI 的长末端重复。Clontech 的 Tet-Off 和 Tet-On 基因表达系统和相似的系统可以用于在哺乳动物细胞中以经调节的途径表达双整联蛋白 (M. Gossen, and H. Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551(1992))。对于 mRNA 的聚腺苷酸化,也可以使用例如人生长激素或球蛋白基因的其它信号。携带整合到染色体中的目的基因的的稳定细胞系也可以通过用可选择标记如 gpt, G418 或潮霉素共转染而进行选择。在开始时使用 G418 加氨甲喋呤等一种以上的可选择标记是有利的。

[0250] 用限制酶消化 pC4 质粒,然后通过本领域公知的程序用小牛肠磷酸酶去磷酸化。然后从 1% 琼脂糖凝胶分离载体。

[0251] 根据已知的方法步骤使用编码完整双整联蛋白抗体的 DNA 序列,其相当于本发明的双整联蛋白抗体的 HC 和 LC 可变区。也使用了编码适当人恒定区 (即 HC 和 LC 区) 的分离核酸。

[0252] 然后用 T4DNA 连接酶连接分离的可变区和恒定区编码 DNA 和去磷酸化的载体。然后转化大肠杆菌 HB 101 或 XL-1 Blue 细胞,并且例如用限制酶分析鉴定含插入 pC4 质粒的片段的细菌。

[0253] 用缺乏 DHFR 基因的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞进行转染。用 0.5 $\mu$ pSV2-neo 质粒采用脂质转染共转染 5 $\mu$ g 表达质粒 pC4。pSV2-neo 质粒含有显性可选择标记,即来自于 Tn5 的 neo 基因,它编码一种酶,该酶赋予对包括 G418 的一组抗生素的抗性。将这些细胞种植在补加 1g/ml G418 的  $\alpha$ -MEM 中。两天后,用胰蛋白酶消化细胞并且种植在杂交瘤克隆板上 (Greiner, Germany),置于补加 10、25 或 50ng/ml 氨甲喋呤的  $\alpha$ -MEM 中。大约 10-14 天后,用胰蛋白酶消化单个克隆,然后种植在 6 孔培养皿或 10ml 烧瓶中,使用不同浓度的氨甲喋呤 (50nM, 100nM, 200nM, 400nM, 800nM)。然后将在最高浓度氨甲喋呤下生长的细胞转染到新的 6 孔板中,该板含有更高浓度的氨甲喋呤 (1mM, 2mM, 5mM, 10mM, 20mM)。重复同样的程序,直到获得在 100-200mM 的浓度下生长的克隆。例如,通过 SDS-PAGE 和蛋白印迹或反相 HPLC 分析所需基因产物的表达。

[0254] 实施例 2:制备和鉴定完全的人双整联蛋白抗体的非限制性实例的方法

[0255] 概要. 用人胎盘  $\alpha$ V $\beta$ 3 免疫含重链和轻链的人可变区和恒定区抗体转基因的 (CBA/J x C57/BL6/J) $F_2$  杂交小鼠 (Taylor et al., *International Immunology* 6:579-591(1993); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859(1994); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826(1996); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14:

845-851(1996))。一次融合产生了 2 个完全的人  $\alpha V\beta 3$  反应性 IgG1  $\kappa$  单克隆抗体,即 Gen0.95 和 Gen0.101。进一步鉴定了完全的人抗  $\alpha V\beta 3$  抗体,发现两种抗体都对  $\alpha V\beta 3$  和  $\alpha V\beta 5$  异二聚体有反应性,这表明了对两种分子对共有的  $\alpha$  链的特异性。一种 Mab,即 CNT095,在基于细胞的测定中抑制  $\alpha V\beta 3$  和  $\alpha V\beta 5$  与玻联蛋白的结合。

[0256] 缩写

[0257] BSA- 牛血清白蛋白

[0258]  $CO_2$ - 二氧化碳

[0259] DMSO- 二甲基亚砷

[0260] EIA- 酶免疫测定

[0261] FBS- 胎牛血清

[0262]  $H_2O_2$ - 过氧化氢

[0263] HC- 重链

[0264] HRP- 辣根过氧化物酶

[0265] Ig- 免疫球蛋白

[0266] IP- 腹膜内

[0267] IV- 静脉内

[0268] Mab- 单克隆抗体

[0269] OD- 光密度

[0270] OPD- 邻苯二胺二盐酸盐

[0271] PEG- 聚乙二醇

[0272] PSA- 青霉素,链霉素,两性霉素

[0273] RT- 室温

[0274] SQ- 皮下

[0275] TBS-Tris 缓冲盐水

[0276] v/v- 体积 / 体积

[0277] w/v- 重量 / 体积

[0278] 引言:

[0279] 我们用含人重链和轻链免疫球蛋白基因的转基因小鼠产生了对  $\alpha V$  整联蛋白具有特异性的完全的人单克隆抗体。这些新抗体可以通过阻断  $\alpha V$  整联蛋白与其各自 ECM 配体的结合而在治疗上用于抑制血管发生过程,并且为各种癌症的治疗提供了额外的工具。

[0280] 材料和方法

[0281] 动物

[0282] 表达人免疫球蛋白而不是小鼠 IgM 或 Ig $\kappa$  的转基因小鼠由 GenPharmInternational 公司开发。这些小鼠含有进行了 V(D)J 连接、重链类转换和体细胞突变,以产生人序列免疫球蛋白所有组成成分 (Taylor et al., International Immunology 6 :579-591(1993))。轻链转基因部分来源于酵母人工染色体克隆,该克隆包括近一半的种系人 V $\kappa$  区。除一些 VH 基因,重链 (HC) 转基因编码人  $\mu$  和人  $\gamma 1$  (Lonberg et al., Nature 368 :856-859(1994)) 和 / 或  $\gamma 3$  恒定区。在免疫和融合过程中使用来源于 HC012 基因系的小鼠,以产生这些单克隆抗体。

**[0283] 纯化人  $\alpha V\beta 3$** 

**[0284]** 用含 20mM Tris pH 7.5, 1mM  $\text{CaCl}_2$ , 1mM  $\text{MnCl}_2$ , 100mM 辛基硫代葡萄糖苷 (来自于 Pierce 的 OTG), 0.05% 叠氮化钠和 1mM 苯甲基磺酰基氟化物 (Sigma) 的盐水提取表达  $\alpha V\beta 3$  整联蛋白的人胎盘 (用肉研磨器破坏) 或 M21 人黑色素瘤细胞。室温下将混合物搅拌 1 小时, 以 10,000xg 离心使其澄清。将来自胎盘提取物的上清液加入由偶联于琼脂糖 (Pharmacia) 的 Mab 10E5 组成的亲和柱中, 以去除 GPIIb/IIIa, 并且将流过的级分加入由偶联于琼脂糖 (Pharmacia) 的 Mab c7E3 Fab 组成的亲和柱中, 以结合  $\alpha V\beta 3$ 。用含 1mM  $\text{CaCl}_2$ , 1mM  $\text{MnCl}_2$  和 0.1% OTG 的 PBS 洗涤 c7E3 柱, 然后用 0.1M 醋酸钠, pH 4.5, 1mM  $\text{CaCl}_2$ , 1mM  $\text{MnCl}_2$  和 0.1% OTG, pH 3.0 洗涤。用 0.1M 甘氨酸, 2% 乙酸, 1mM  $\text{CaCl}_2$ , 1mM  $\text{MnCl}_2$  和 0.1% OTG 洗脱柱。用 2M Tris pH 8.5 中和含纯化  $\alpha V\beta 3$  的洗脱液。通过 SDS-PAGE 分析和 ELISA 排除 GPIIb/IIIa 污染而鉴定制备物的纯化产物 (Wayner, et al., J. Cell Biol. 113: 919-929 (1991))。

**[0285] 免疫**

**[0286]** 用等体积的氟氏完全佐剂乳化的总共 20  $\mu\text{g}$  胎盘  $\alpha V\beta 3$  (prep V 级分, JG21197) IP (200  $\mu\text{l}$ ) 和在两个位点 SQ (每个位点 100  $\mu\text{l}$ ) 免疫从 GenPharm 获得的 15-17 周龄的手术去势雄性小鼠 (第 0 天)。两周后以相同方式用等体积的氟氏不完全佐剂乳化的  $\alpha V\beta 3$  免疫小鼠。随后在第 28, 42 和 56 天与氟氏不完全佐剂一起以 10  $\mu\text{g}$  IP/10  $\mu\text{g}$  SQ 注射。在第 42 和 56 天可以通过不抗凝条件下的眶后穿刺而从小鼠取血。然后使血液在 RT 下凝固 1 小时, 收集血清, 根据已知的方法采用  $\alpha V\beta 3$  固相 EIA 测定滴度。当重复注射不导致滴度增加时进行融合, 称作 Gen0。此时抗  $\alpha V\beta 3$  的特异性人 IgG 滴度为 1 : 1280 的小鼠然后接受稀释于 100  $\mu\text{L}$  生理盐水的 10  $\mu\text{g}$   $\alpha V\beta 3$  的最后一次 IV 加强注射。3 天后, 通过断颈椎处死小鼠, 在无菌条件下去除脾, 浸入含有 100U/mL 青霉素、100  $\mu\text{g/mL}$  链霉素、和 0.25  $\mu\text{g/mL}$  两性霉素 B (PSA) 的 10mL 冰冷盐酸缓冲盐水 (PBS)。通过用 PSA-PBS 无菌灌注脾而收获脾细胞, 用台盼蓝染色排除法计数, 并且重悬于含 25mM HEPES 的 RPMI 1640 培养基。

**[0287] 细胞系**

**[0288]** 在 93 年 9 月 1 日将与非分泌性小鼠骨髓瘤融合的 SP2/0 接受至细胞生物服务 (CBS) 组。在补加了 10% (v/v) FBS (Cell Culture Labs), 1mM 丙酮酸钠, 0.1mM NEAA, 2mM L-谷氨酰胺 (均来自 JRH Biosciences) 的  $\alpha$  MEM (改良的) 培养基 (JRH Biosciences) 中扩增细胞系, 并且冷冻保存在 95% FBS 和 5% DMSO (Sigma) 中, 然后在 CBS 中的气相液氮冷藏器中储存。细胞库是无菌的 (Quality Control Centocor, Malvern) 并且不含支原体 (Bionique Laboratories)。将细胞维持于对数相, 直到融合。在 PBS 中洗涤细胞, 计数, 在融合前通过台盼蓝排除测定存活率 (> 95%)。

**[0289]** 扩增表达  $\alpha V\beta 3$  和  $\alpha V\beta 5$  整联蛋白的人骨髓瘤细胞, 即 M21 细胞系。将 10 个管型瓶的研究细胞库接受至细胞生物服务组并且储存在液氮中。细胞库是无菌的并且不含支原体 (Bionique Laboratories)。MDAMB435L2 细胞系, 即表达整联蛋白  $\alpha V\beta 3$  的人乳腺癌细胞, 是由 Janet Price 博士 (MD Anderson, Houston TX) 赠送的。将细胞系冷冻保存在细胞生物服务组。细胞库是无菌的并且不含支原体 (Bionique Laboratories)。将 M21 和 MDAMB435L2 细胞解冻, 在适当的培养基中增殖并且在生物测定前几天内将细胞维持于对数相, 或使其达到汇合, 用于纯化  $\alpha V\beta 3$  蛋白 (M21 细胞)。

**[0290] 细胞融合**

**[0291]** 采用比例为 1 : 1 的鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 与存活脾细胞进行细胞融合。简言之, 将脾细胞和骨髓瘤细胞一起沉淀。然后在 37°C 下, 在 1mL 50% (w/v) PEG/PBS 溶液 (PEG 分子量 1450, Sigma) 中重悬沉淀 30 秒以上。然后通过缓慢加入 1mL Dulbecco's PBS (JRH) (37°C) 1 分钟以上, 以便终止融合。在接下来的 90 秒中加入 19mL PBS。以 750rpm 将融合细胞离心 5 分钟。然后将细胞重悬于 HAT 培养基 ( $\alpha$  MEM 培养基, 含有 20% 胎牛血清 (JRH), 1mM 丙酮酸钠, 2mM L-谷氨酰胺, 0.1mM 非必需氨基酸, 10  $\mu$ g/mL 庆大霉素, 2.5% Origen 培养补充物 (Fisher), 50  $\mu$ M 2-巯基乙醇, 100  $\mu$ M 次黄嘌呤, 0.4  $\mu$ M 氨基嘌呤和 16  $\mu$ M 胸苷), 并且以 200  $\mu$ L/孔平铺于 13 个 96 孔平底组织培养板。然后将板置于含有 5% CO<sub>2</sub> 和 95% 空气的潮湿的 37°C 孵育器中 7-10 天。

**[0292] 检测小鼠血清中的人 IgG 抗  $\alpha$  V  $\beta$  3 抗体**

**[0293]** 可以用固相 EIA 从小鼠血清中筛选人  $\alpha$  V  $\beta$  3 的特异性人 IgG 抗体。简言之, 用 PBS 中的 1  $\mu$ g/mL  $\alpha$  V  $\beta$  3 包被平板过夜。在含有 0.02% (v/v) Tween 20 的 0.15M 盐水中洗涤后, 用 HBSS 中的 1% (w/v) BSA, 以 200  $\mu$ L/孔在 RT 下封闭各个孔 1 小时。立即使用平板或在 -20°C 下冷冻, 以便将来使用。在  $\alpha$  V  $\beta$  3 包被的板上以 50  $\mu$ L/孔在 RT 下孵育小鼠血清的 2 倍系列稀释液 1 小时。洗涤平板, 然后用在 1% BSA-PBS 中 1 : 30000 特异性 (准确) 稀释的 50  $\mu$ L/孔 HRP 标记的山羊抗人 IgG Fc 在 RT 下探测 1 小时。再次洗涤平板, 在 RT 下加入 100  $\mu$ L/孔柠檬酸盐-磷酸盐底物溶液 (0.1M 柠檬酸和 0.2M 硫酸钠, 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 1mg/mL OPD) 15 分钟。然后加入 25  $\mu$ L/孔终止溶液 (4N 硫酸), 在 490nm 下通过自动平板分光光度计读出 OD 值。

**[0294] 在杂交瘤上清液中检测完全的人免疫球蛋白**

**[0295]** 由于 GenPharm 小鼠能够产生小鼠和人免疫球蛋白链, 使用两个独立的 EIA 检测生长阳性杂交瘤克隆中人轻链和人重链的存在。按上述方法包被板, 37°C 下在板上孵育未稀释的杂交瘤上清液。洗涤平板, 然后用 HRP 标记的山羊抗人 IgG<sub>1</sub> 在室温下探测 1 小时。洗涤平板, 然后用在 1% BSA-HBSS 中 1 : 10000 稀释的 HRP 偶联的山羊抗人  $\kappa$  (SouthernBiotech) 抗体或在 1% BSA-PBS 中 1 : 30000 稀释的 HRP 偶联的山羊抗人 IgG Fc 特异性抗体在 37°C 下探测 1 小时。然后按上述方法用底物溶液孵育板。

**[0296] 同种型分析**

**[0297]** 使用 EIA, 采用类似于在小鼠免疫血清中筛选特异性滴度的形式完成抗体的同种型测定。按上述方法将  $\alpha$  V  $\beta$  3 包被在 96 孔板上, 将 2  $\mu$ g/mL 的纯化抗体在板上 RT 下孵育 1 小时。洗涤平板, 用 HRP 标记的山羊抗人 IgG<sub>1</sub> (结合位点) 或在 1% BSA-HBSS 中 1 : 4000 稀释的 HRP 标记的山羊抗人 IgG<sub>3</sub> (zymed) 在 RT 下探测 1 小时。然后按上述方法再次洗涤板, 并且用底物溶液孵育板。

**[0298] 通过 EIA 测定的人单克隆抗体的结合特征**

**[0299]** 用  $\alpha$  V  $\beta$  3 捕获 EIA 评估抗体的结合特征。4°C 下用溶于含 2mM 钙的 TBS 的 1  $\mu$ g/mL  $\alpha$  V  $\beta$  3 包被 Linbro 板过夜。洗涤板, 室温下用 TBS/1% BSA/钙封闭至少 1 小时。在起始浓度为 2  $\mu$ g/mL 的加倍稀释液中孵育纯化抗体。洗涤板, 加入偶联的抗体 (1 : 30,000 的 HRP 标记的山羊抗人 IgG Fc), 在室温下孵育 1 小时。洗涤板, 将 OPD 底物加入各孔, 通过自动平板分光光度计读出 OD 值。

[0300] 通过各种商购抗整联蛋白 Mabs 竞争 Gen095 与 M21 细胞的结合

[0301] 用胰蛋白酶从培养烧瓶消化 M21 细胞,洗涤并重悬于 HBSS/ 钙至  $2 \times 10^6$  细胞 / mL。RT 下用 FITC- 山羊抗人 Fc (Jackson) 预标记 Gen095 30 分钟。用  $250 \mu\text{g/mL}$  FITC 山羊抗人 IgG 孵育  $10 \times$  浓度的  $200 \mu\text{g/mL}$  或  $20 \mu\text{g/mL}$  Gen095。37°C 下用高 (最终  $20 \mu\text{g/mL}$ ) 和低 (最终  $2 \mu\text{g/mL}$ ) 浓度的  $12 \mu\text{L}$   $10 \times$  Gen095  $\pm 12 \mu\text{L}$  以下鼠抗体孵育  $100 \mu\text{L}$  M21 细胞 ( $2 \times 10^5$  细胞) 的等分物 45 分钟: m7E3 IgG, 抗  $\alpha\text{V}\beta 3$  (克隆 LM609, Chemicon), 或抗  $\alpha\text{V}\beta 5$  (克隆 P1F6, Gibco), 抗  $\beta 3$  (Chemicon, AMAC), 或抗  $\alpha\text{V}$  (克隆 VNRI39, Gibco) 抗体 ( $20 \mu\text{g/mL}$ )。从每一试管取出一份等分物 (进行两色分析), 剩余者与 1% 低聚甲醛混合, 在流式细胞仪上分析。为进行两色分析, 在 RT 下用 PE- 山羊抗小鼠 IgG 孵育等分物 ( $50 \mu\text{L}$ ) 30 分钟, 以标记鼠抗  $\alpha\text{V}\beta 3$ , 抗  $\alpha\text{V}\beta 5$ , 抗  $\beta 3$ , 或抗  $\alpha\text{V}$  抗体。用 1% 低聚甲醛固定所有试管。

[0302] 通过  $\alpha\text{V}\beta 3/\alpha\text{V}\beta 5$  特异性 Mabs 抑制  $\alpha\text{V}\beta 3$  或  $\alpha\text{V}\beta 5$  依赖性的 M21 细胞或 MDAMB435L2 细胞与玻连蛋白包被的板的粘附

[0303] 在室温下用溶于含 2mM 钙的 TBS 的  $5 \mu\text{g/mL}$  玻连蛋白以  $50 \mu\text{L}$  / 孔包被 Linbro 板 1 小时。用 HBSS/ 钙洗涤板, RT 下用溶于含 2mM 钙的 TBS 和 1% BSA 封闭 30 分钟。用胰蛋白酶消化 M21 细胞, 用含 FCS 的培养基洗涤并重悬于 3mL 无钙的 HBSS。所有的洗涤通过在 Sorvall 台式离心机中以 1000rpm 旋转 10 分钟而完成。为对细胞进行荧光标记, 将 calcein (Molecular Probes) ( $5\text{mg/mL}$ , 溶于 DMSO) 加至细胞, 以便在 50mL 锥形试管 (用锡箔包裹) 中达到  $100 \mu\text{g/mL}$  的浓度。将细胞在 37°C 孵育 10-15 分钟。用 HBSS 洗涤 Calcein 包被的细胞 1 次, 重悬于补加 0.1% BSA 和 1mM  $\text{MgCl}_2$  的 HBSS。在 HBSS/0.1% BSA/2mM 钙中以  $10 \times$  的终浓度滴定抗体 (14 倍系列稀释)。用抗体滴定液 ( $37 \mu\text{L}$   $10 \times$  溶液)  $\pm$  抗  $\alpha\text{V}\beta 5$  (P1F6) 腹水 (Chemicon) ( $37 \mu\text{L}$  1 : 600 ( $10 \times$ )) 在 37°C 预孵育细胞 ( $300 \mu\text{L}$ ,  $7.5 \times 10^6/\text{mL}$ ) 15 分钟。将细胞 - 抗体混合物以  $100 \mu\text{L}$  / 孔 (约  $6 \times 10^6$  细胞 / 孔) 加入玻连蛋白包被的板, 共使用三份。将板在 37°C 孵育 45 分钟。通过两次 HBSS/ 钙 ( $150 \mu\text{L}$  / 孔) 洗涤去除未结合细胞。向每孔中加入  $10 \mu\text{L}$  HBSS/ 钙, 在 485-538nm 下在 Fluoroskan 上对板进行读数。

[0304] 在一项独立的测定中, 用乙二醇四乙酸收获 MDAMB435L2 人乳腺癌细胞, 并且以 500,000 细胞 / mL 重悬于无血清培养基中, 用各种浓度的 Gen095 孵育。孵育 10 分钟后, 将肿瘤细胞悬浮液 ( $100 \mu\text{L}$ ) 加入玻连蛋白 ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) 包被的 Linbro 板, 在 37°C 孵育。1 小时后, 用无血清培养基洗涤各孔 3 次 ( $200 \mu\text{L}$  / 洗涤), 向每孔中加入基于 MTT 的细胞滴度 AQ 染料 (Promega)。在 ELISA 板中测定细胞粘附程度, 其中 OD490nm 与细胞粘附成正比。对 BSA 包被的孔的细胞粘附作为阴性对照。

[0305] 测定  $\alpha\text{V}\beta 3/\alpha\text{V}\beta 5$  Mabs 与其配体的  $\text{Ca}^{++}$  依赖性结合

[0306] 为测定 CNT095 和 C372 与  $\alpha\text{V}\beta 3$  或  $\alpha\text{V}\beta 5$  结合的阳离子依赖性, 使用液相 EIA。4°C 下用溶于碳酸盐包被缓冲液的  $10 \mu\text{g/mL}$  的 CNT095, C372, c7E3 或 LM609 IgG Mabs 包被 EIA 板 (Corning) 过夜。用稀释于含或不含  $2\text{mM}\text{Ca}^{++}$  的 HBSS 的 1% BSA 封闭板至少 1 小时。浓度从  $10 \mu\text{g/mL}$  开始的  $\alpha\text{V}\beta 3$  (log JG52599) 或  $\alpha\text{V}\beta 5$  (Chemicon) 的加倍稀释液用溶于 1% BSA/ 无钙 HBSS 或 1% BSA/ 含钙 HBSS 的 50mM EDTA (Sigma) 37°C 下预孵育 30 分钟。然后将混合物加入板, 在 37°C 下孵育 30 分钟。然后洗涤板, 将非竞争性 Mabs 加入板: 加入 CNT095, C372, c7E3 包被的板中以检测  $\alpha\text{V}\beta 3$  结合, Mab CNT095 在 1% BSA/HBSS



Ca<sup>++</sup> 中以 20 μg/mL 加入 ;加入 LM609 包被的板中以检测 α V β 3 结合, Mab LM609 在 1% BSA/HBSS Ca<sup>++</sup> 中以 20 μg/mL 加入 ;加入 CNT0 95, C372, c7E3 包被的板中以检测 α V β 5 结合, Mab VNR139(Gibco) 在 1% BSA/HBSS Ca<sup>++</sup> 中以 10 μg/mL 加入 ;在 37°C 下孵育 30 分钟。再次洗涤板,用 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG Fc 或 HRP 标记的山羊抗人 IgG Fc 在适当的缓冲液中探测,在 37°C 下孵育 30 分钟。洗涤板,加入 OPD 底物,按上文的描述测量 OD 490。

[0307] 结果和讨论

[0308] 完全的人类抗人 α V β 3 单克隆抗体的产生

[0309] 用 α V β 3 蛋白免疫的 GenPharm 小鼠进行一种称作 Gen0 的融合。通过该融合筛选了 129 种生长阳性杂交体。鉴定了分泌与人 α V β 3 反应的完全的人 IgG 抗体的两种杂交瘤细胞系。这两种细胞系, Gen0. 95. 9. 12 和 Gen0. 101. 17. 22 的每一种都分泌人 IgG1 κ 同种型的免疫球蛋白,并且每一种都通过有限稀释进行两次亚克隆,以获得稳定的细胞系 (> 90% 均质)。细胞系 Gen0. 95. 9. 12 的 C 代码为 #CNT0 95, Gen0. 101. 17. 22 的 C 代码为 #C372A。每一种细胞系冷冻于储存于液氮中的 12- 管形瓶研究细胞库。

[0310] 通过 EIA 测定的人单克隆抗体的结合特征

[0311] ELISA 分析证明从两种杂交瘤 CNT0 95 和 C372A 得到的纯化抗体以浓度依赖性方式结合 α V β 3。图 1 表示抗体的相对结合效率。C372A 和 CNT095 分别在 0.07 和 0.7 μg/mL 的浓度下达到 50% 的结合。在同样的测定中, c7E3IgG 在 0.7 μg/mL 表现出 50% 最大结合。

[0312] 通过各种商购抗整联蛋白 Mabs 竞争 Gen095 与 M21 细胞的结合

[0313] 通过单色分析,鼠抗 α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>, 抗 α<sub>v</sub>β<sub>5</sub>, 抗 β<sub>3</sub>, 或抗 α<sub>v</sub> 抗体都不与 CNT0 95 竞争结合 M21 细胞 (表 1)。该实验也证明 Gen095 与 M21 细胞以剂量依赖性方式结合。两色分析证明鼠抗 α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>, 抗 α<sub>v</sub>β<sub>5</sub>, 抗 β<sub>3</sub>, 或抗 α<sub>v</sub> 抗体能够结合 M21 细胞 (数据未示出)。

[0314] 表 1 :鼠抗整联蛋白 Mabs 对 Gen095 结合 M21 细胞的竞争

竞争性抗体	FITC- 山羊抗人		FC-标记的 Gen095	
	2 μg/mL		20 μg/mL	
	MCF	% 阳性	MCF	% 阳性
阴性 (无 Gen95)	2.69		2.69	
阳性 (盐水)	4.33	100%	14.33	100%
[0315] m7E3 IgG	5.73	132%	14.72	103%
LM609 (抗 -α <sub>v</sub> β <sub>3</sub> )	4.78	110%	13.34	93%
抗 -β <sub>3</sub> (Chemicon)	5.42	125%	13.10	91%
抗 -β <sub>3</sub> (AMAC)	4.61	106%	13.10	91%
P1F6 (抗 -α <sub>v</sub> β <sub>3</sub> )	4.87	112%	14.46	101%
VNR139 (抗 -α <sub>v</sub> )	4.61	106%	14.86	104%

[0316] MCF = 中间通道荧光

[0317] 通过  $\alpha V\beta 3/\alpha V\beta 5$  特异性 Mabs 抑制  $\alpha V\beta 3$  或  $\alpha V\beta 5$  依赖性的 M21 细胞或 MDAMB435L2 细胞与玻连蛋白包被的板的粘附

[0318] M21 细胞以  $\alpha V\beta 3$  和  $\alpha V\beta 5$  依赖性方式粘附于玻连蛋白包被的板。因此,要求  $\alpha V\beta 3$  和  $\alpha V\beta 5$  的阻断以完全抑制 M21 细胞与玻连蛋白包被的板的结合。C372A 在 P1F6, 抗  $\alpha V\beta 5$  腹水存在或不存在下不抑制 M21 细胞粘附 (图 2)。Gen095 (CNT0 95) 在抗  $\alpha V\beta 5$  (P1F6) 腹水存在或不存在下都完全抑制 M21 细胞与玻连蛋白包被的板结合, 这表明抗体阻断  $\alpha V\beta 3$  和  $\alpha V\beta 5$ 。作为测定参数的对照, 引入了阻断  $\alpha V\beta 3$  的 ReoPro (c7E3 Fab) (除 GPIIb/IIIa 外)。单独的 ReoPro 仅仅部分抑制 M21 细胞粘附, 抗  $\alpha V\beta 5$  (P1F6) 腹水存在下的 ReoPro 完全抑制粘附, 这证明 M21 细胞通过  $\alpha V\beta 3$  或  $\alpha V\beta 5$  整联蛋白结合玻连蛋白。将数据标准化为拮抗剂不存在下 +/- 抗  $\alpha V\beta 5$  (P1F6) 腹水时的最大 M21 细胞结合的百分比。对于没有 P1F6 的拮抗剂滴度, 将数据标准化为不存在拮抗剂或 P1F6 时的最大 M21 细胞结合。对于 P1F6 存在下的拮抗剂滴度, 将数据标准化为不存在拮抗剂但存在 P1F6 时的最大结合。将数据作图为最大结合 (无抗体) 百分比, 用 GraphPad Prism 进行非线性回归。

[0319] 也证明了 Gen095Mab 在  $1.5 \mu\text{g/mL}$  的最低浓度下完全抑制 MDAMB435L2 细胞与玻连蛋白粘附 (图 3)。这些数据的结合表明 M21 细胞粘附的抑制, 证明 Gen095 功能性抑制  $\alpha V\beta 3$  和 / 或  $\alpha V\beta 5$  受体与玻连蛋白相互作用的能力。

[0320] 测定  $\alpha V\beta 3/\alpha V\beta 5$  Mabs 与其配体的  $\text{Ca}^{++}$  依赖性结合

[0321] 已知钙阳离子的存在是 Mab c7E3 与  $\alpha V\beta 3$  结合所必须的, 而对 MabLM609 与  $\alpha V\beta 3$  的结合则不是必须的, 这是分别由图 4c 和 4d 证明的。进行该实验以评估钙依赖性是否适用于 CNT0 95 或 C372 对  $\alpha V\beta 3$  或  $\alpha V\beta 5$  整联蛋白的结合特征。将过量浓度的 EDTA 引入测定中以螯合存在于整联蛋白异二聚体的结合袋中的 Ca, 因此, 结合是在不存在阳离子的条件下评估的。发现 CNT0 95 和 C372 与  $\alpha V\beta 3$  的结合不依赖于 Ca 的存在 (图 4a, 4b)。CNT0 95 与  $\alpha V\beta 5$  的结合也是如此, 然而, 对于 C372 与  $\alpha V\beta 5$  的结合 (图 4e, 4f) 则并非如此, 其结合似乎在 Ca 存在下增加。

[0322] 结论

[0323] 用来自于人  $\alpha V\beta 3$  免疫的含人可变区和恒定区抗体转基因的杂交小鼠的脾细胞进行 Gen0 融合。产生了两种完全的人  $\alpha V\beta 3$  反应性 IgG 单克隆抗体, 它们属于 IgG1  $\kappa$  同种型。对这些 Mabs 进一步鉴定, 发现这两种抗体都结合  $\alpha V\beta 3$  和  $\alpha V\beta 5$  整联蛋白。证明了这两种 Mabs 与  $\alpha V\beta 3$  的结合是不依赖于钙的, 而只有 C372 与  $\alpha V\beta 5$  的结合依赖于钙。而且, 一种 Mab, Gen095 (CNT0 95) 在基于细胞的测定中能够完全抑制  $\alpha V\beta 3$  和  $\alpha V\beta 5$  与配体玻连蛋白的结合。可以证明该 Mab 可用于抗血管生成和其它癌相关应用。

[0324] 参考文献:

[0325] 1. Taylor et al., International Immunology 6 :579-591 (1993).

[0326] 2. Lonberg et al., Nature 368 :856-859 (1994).

[0327] 3. Neuberger, Nature Biotechnology 14 :826 (1996).

[0328] 4. Fishwild et al., Nature Biotechnology 14 :845-851 (X996).

[0329] 5. Gastl et al., Oncology 54 :177-184 (1997).

[0330] 6. Eliceiri, et al., J. Clin. Invest. 103 :1227-1230 (1999).

[0331] 7. Friedlander et al., Science 270 :1500-1502 (1995).

[0332] 8. Wayner, et al., J. Cell Biol. 113 :919-929 (1991).

[0333] 实施例 3 :双整联蛋白抗体的结合亲和性

[0334] 引言

[0335] Gen0.95, 也称为 CNT0.95, 是一种由用纯化自人胎盘的  $\alpha_v\beta_3$  整联蛋白免疫的 F2 杂交小鼠 (CBA/J x C57/BL6/J, GenPharm International) 产生的人单克隆抗体。该抗体由人可变区和 IgG1  $\kappa$  恒定区组成, 发现它与  $\alpha_v\beta_3$  和  $\alpha_v\beta_5$  都反应, 这表明两种整联蛋白分子具有相同的  $\alpha$  链特异性。

[0336] 目的

[0337] 本研究的目的是鉴定 Gen0.95 对  $\alpha_v\beta_3$  和  $\alpha_v\beta_5$  纯化整联蛋白的结合亲和性和对  $\beta$  整联蛋白表达细胞系的结合亲和性。为进一步鉴定, 将比较 Gen0.95 和 ReoPro 之间的结合值。

[0338] 缩写

[0339] Kd, 平衡解离常数, 表达为 M

[0340] Bmax = 结合位点的最大数目

[0341] 材料和方法

[0342] 细胞系

[0343] A375S2 细胞, 即一种表达  $\alpha_v\beta_3$  和  $\alpha_v\beta_5$  整联蛋白的人黑色素瘤细胞系, 在含 10% 胎牛血清 (FBS, Cell Culture Labs), 1mM 丙酮酸钠, 0.1mM 非必需氨基酸和 2mM L-谷氨酰胺 (均来自于 JRH Biosciences) 的 Dulbecco's 最小培养基 (DMEM) 中培养。

[0344] HT29 细胞, 即一种表达  $\alpha_v\beta_5$  和极少  $\alpha_v\beta_3$  的人结肠癌细胞系 (NB4546, p207), 在含 10% FBS, 1mM 丙酮酸钠, 0.1mM 非必需氨基酸和 2mM L-谷氨酰胺的 Dulbecco's DMEM 中培养。

[0345] M21 细胞, 即来自于 J. Jakubowski 博士 (Eli Lilly, Inc.) 的一种表达  $\alpha_v\beta_3$  和  $\alpha_v\beta_5$  整联蛋白的人黑色素瘤, 在含 10% FBS, 1mM 丙酮酸钠, 0.1mM 非必需氨基酸和 2mM L-谷氨酰胺的 RPMI 培养基 (JRHBiosciences) 中培养。

[0346] 整联蛋白

[0347] 在 Centocor 从胎盘纯化  $\alpha_v\beta_3$  批号 JG22499。另一批  $\alpha_v\beta_3$  整联蛋白 (辛基制剂, 批号 19100991) 购自 Chemicon。 $\alpha_v\beta_5$  (Triton 制剂, 批号 20030055, 批号 1910990 和辛基制剂, 批号 19060747) 购自 Chemicon。

[0348] 抗体

[0349] Gen0.95 通过蛋白 A 层析纯化自细胞培养物上清液。ReoPro 由 Centocor 公司生产。一种鼠抗人  $\alpha_v\beta_3$  抗体 LM609, (1976ZK, 批号 20020559 和批号 1910329) 和一种鼠抗人  $\alpha_v\beta_5$  抗体 P1F6 (1961P-K, 批号 17110560) 购自 Chemicon。

[0350] 放射性标记

[0351] 用碘珠 (Pierce Chemicals, IL) 对抗体进行  $^{125}\text{I}$  Na (Amersham, IL) 放射性标记, 使其比活性为 1-2  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 。用 280nm 的吸收 (OD/ml) 除以 1.4, 测定抗体浓度 (mg/ml)。稀释抗体并在  $\gamma$  计数器或 Topcounter (Packard) 中对等分物进行计数, 以便测定碘标记抗

体的比活性。

[0352]

$$\text{比活性 (cpm/}\mu\text{g)} = \frac{\text{cpm/体积 (ml)} \times \text{稀释因子}}{\text{浓度}(\mu\text{g/ml, 由 } OD_{280} \text{ 读数测定)}$$

[0353] 整联蛋白包被的板的结合测定

[0354] 在含 2mM 氯化钙 (TBS/Ca<sup>++</sup>) Tris 缓冲盐水 (TBS, 10mM Tris, 100mM NaCl, pH 7.5) 中将  $\alpha_v\beta_3$  或  $\alpha_v\beta_5$  整联蛋白稀释至 1  $\mu\text{g/ml}$ , 4°C 下以 50  $\mu\text{l}$ /孔包被至 96 孔聚苯乙烯 Linbro 板 (Flow/ICN) 过夜。用 TBS/Ca<sup>++</sup> 洗涤板, 用溶剂 TBS/Ca<sup>++</sup> 的 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 室温下包被 1 小时。将三份 50  $\mu\text{l}$  的稀释抗体加入包被的孔中, 在 37°C 孵育 2 小时。用 TBS-Tween 缓冲液 (TBS+0.1% Tween 20) 洗涤 3 次后, 加入在 1% BSA-TBS 中 1:40:000 稀释的过氧化酶偶联的山羊抗人 IgG F(ab')<sub>2</sub> (H+L, Jackson 批号 16869), 在室温下孵育 1 小时。将板洗涤 3 次, 用由 0.1M 柠檬酸、0.2M 磷酸钠、0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 1mg/ml OPD 组成的邻苯二胺二盐酸盐底物溶液 (OPD, Sigma) 显色。室温下 15 分钟后用 0.3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止显色, 在 MolecularDynamics 板读数器中 OD<sub>490nm</sub> 下对板进行读数。

[0355] 用 GraphPad PRISM (版本 3, GraphPad Software) 产生结合曲线。结果表示为饱和值的 % 最大结合。通过用 PRISM 对数据进行非线性回归拟合而测定平衡解离结合常数 K<sub>d</sub> (表示为 M)。

[0356] 细胞结合测定

[0357] 将三份溶于含 2% 牛血清白蛋白 (JRH Biosciences) 的 2% RPMI 中的 50  $\mu\text{l}$  加入在 96 孔培养板 (Packard) 上培养的汇合细胞。37°C 孵育细胞 1.5 小时。用含钙和镁的 Hanks 缓冲盐水 (HBSS++, JRH Biosciences) 轻柔洗涤三次, 然后吸出。每孔加入 100  $\mu\text{l}$  Mycosinct 20 (Packard, 在 TopCounter (Packard) 中对细胞结合放射性进行定量。

[0358] 为测定非特异性结合, 在 100 倍过量的未标记抗体存在下用相似系列的稀释液进行实验。

[0359] 为测定铺于每孔的细胞数目, 用胰蛋白酶将细胞重从每孔中取出, 合并, 并且在显微镜下计数。每细胞的受体数目计算如下:

[0360]

$$\text{受体数目/细胞} = \frac{\text{特异性结合的 cpms} \times 6.023 \times 10^{23} \text{ 分子/mol}}{\text{比活性 (cpm/g)} \times \text{mol. wt. (g/mol)} \times \text{细胞数目}}$$

[0361] 用 PRISM 对数据进行非线性回归拟合, 以测定每细胞的最大结合位点数目 B<sub>max</sub>, 和 K<sub>d</sub>。

[0362] 结果和讨论

[0363] 通过测量各种浓度的 Gen0.95 (和 ReoPro) 与纯化  $\alpha_v\beta_3$  和  $\alpha_v\beta_5$  和细胞表面受体在平衡状态下的结合而进行亲和性值的测定。饱和结合曲线为直角双曲线, 表明对 Gen0.95 和 ReoPro 的单受体结合位点 (图 5-6; Motulsky H, 1999)。用 PRISM 进行单点双曲线非线性回归拟合进行这些饱和结合数据的分析 (有时称作 Scatchard 实验), 以获得亲和性 K<sub>d</sub> 和受体数目, B<sub>max</sub> (Motulsky H, 1999)。

[0364] 用一些批号的 Gen0.95, ReoPro 和纯化的整联蛋白确保结合亲和性值的准确测定。Gen0.95 在  $\alpha_v\beta_3$  包被的板上的饱和结合曲线 (图 5A) 和 ReoPro 在  $\alpha_v\beta_3$  包被的板

上的结合曲线 (图 5B) 表示 6 次独立实验的平均值和标准差。发现用  $\alpha_v\beta_3$  的 Triton 制剂获得的结果比用辛基制剂获得的结果的可重复性强。在  $\alpha_v\beta_3$  包被的板上, Gen0.95 平均 Kd 为  $2.1 \pm 1.33 \times 10^{-10} M$ ; ReoPro 平均 Kd 为  $2.5 \pm 1.46 \times 10^{-10} M$ 。

[0365] Gen0.95 在  $\alpha_v\beta_5$  包被的板上的饱和结合曲线 (图 6A) 和 ReoPro 在  $\alpha_v\beta_5$  包被的板上的结合曲线 (图 6B) 表示 6 次独立实验的平均值和标准差。用辛基制剂获得的结果比从 Triton 制剂获得的结果一致性强。Gen0.95 在  $\alpha_v\beta_5$  包被的板上的平均 Kd 为  $2.5 \pm 1.04 \times 10^{-11} M$ 。发现 ReoPro 对  $\alpha_v\beta_5$  包被的板无结合和无剂量反应。

[0366] 纯化整联蛋白的结合亲和性值与结合在各种细胞系上表达的受体相似。图 7A-C 表示 125-I Gen0.95 与表达  $\alpha_v\beta_3$  和  $\alpha_v\beta_5$  的 A375S2 细胞的结合 (图 7A)。A375S2 上的平均亲和性值为  $Kd = 5.2 \pm 2.04 \times 10^{-9} M$ ; 以及  $120,000 \pm 37,000$  受体 / 细胞。HT-29 细胞表达  $\alpha_v\beta_5$ 。125-I Gen0.95 与 HT-29 细胞结合的亲和性值为  $Kd = 1.3 \pm 3.76 \times 10^{-10} M$ ; 以及  $81,000 \pm 24,000$  受体 / 细胞 (图 7B)。M21 表达  $\alpha_v\beta_3$  和  $\alpha_v\beta_5$ 。125-I Gen0.95 与 M21 细胞结合的亲和性值为  $Kd = 8.5 \pm 3.03 \times 10^{-9} M$ ; 以及  $200,000 \pm 80,000$  受体 / 细胞 (图 7C)。

[0367] 用 125-I ReoPro 对各种细胞系进行了相似的细胞结合研究。图 8A-C 表示 125-I Gen0.95 与 A375S2 细胞的结合, 获得的平均值为  $Kd = 33 \pm 3.7 \times 10^{-9} M$ ; 以及  $370,000 \pm 190,000$  受体 / 细胞 (图 8A)。在 HT-29 上, 125-I ReoPro 表现出极少的结合 (图 8B)。125-I ReoPro 与细胞的结合表现为:  $Kd = 10 \pm 2.00 \times 10^{-9} M$ ; 以及  $660,000 \pm 120,000$  受体 / 细胞 (图 8C)。125-I ReoPro 在 M21 细胞上的值与以前公开的值一致 (Tam et al, 1998)。

[0368] 结合结果的概括总结于表 2-3。

[0369] 表 2. Gen0.95 和 ReoPro 与纯化整联蛋白的亲和性的概括

[0370]

	$\alpha_v\beta_3$ 包被的板 (n = 6)	$\alpha_v\beta_5$ 包被的板 n = 6)
	Kd (M)	Kd (M)
Gen0.95	$2.1 \pm 1.33 \times 10^{-10}$	$2.5 \pm 1.04 \times 10^{-11}$
ReoPro	$2.5 \pm 1.46 \times 10^{-10}$	可忽略

[0371] 表 3. Gen0.95 和 ReoPro 与细胞的亲和性的概括

[0372]

	A375S2 细胞	A375S2 细胞	HT-29 细胞	HT-29 细胞	M21 细胞	M21 细胞
	Kd (M)	受体 / 细胞	Kd (M)	受体 / 细胞	Kd (M)	受体 / 细胞

	A375S2 细胞	A375S2 细胞	HT-29 细胞	HT-29 细胞	M21 细胞	M21 细胞
Gen0.95	$5.2 \pm 2.04 \times 10^{-9}$ (n = 5)	120,000 $\pm 37,000$ (n = 7)	$1.3 \pm 0.38 \times 10^{-9}$ (n = 5)	81,000 $\pm 24,000$ (n = 7)	$8.5 \pm 3.03 \times 10^{-9}$ (n = 4)	200,000 $\pm 80,000$ (n = 8)
ReoPro	$22 \pm 3.7 \times 10^{-9}$	370,000 $\pm 190,000$ (n = 6)	可忽略 (n = 4)	可忽略 (n = 4)	$10 \pm 2.00 \times 10^{-9}$ (n = 3)	660,000 $\pm 120,000$ (n = 7)

[0373] (国际公开时缺页)

[0374] 在三维纤维蛋白基质中培养,从而证明该抗体可能具有潜在的抗血管发生特性。

[0375] 引言

[0376] 目前有足够的证据证明进展性的肿瘤生长依赖于血管发生,即新血管的形成。这些血管为肿瘤提供了营养和氧气,带走废物,并且作为肿瘤细胞转移至远处位点的导管(1)。最近的研究进一步证明了整联蛋白在血管发生过程中的各种作用。整联蛋白是在介导细胞粘附、迁移、存活和增殖中起重要作用的异二聚体跨膜蛋白(2)。整联蛋白  $\alpha_v \beta_3$  的表达在静止或正常血管中极少,但在血管发生中的血管细胞上显著上调(1-3)。也证明了密切相关但不同的整联蛋白  $\alpha_v \beta_5$  介导血管发生过程。抗  $\alpha_v \beta_3$  抗体阻断碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)诱导的血管发生,而  $\alpha_v \beta_5$  的特异性抗体抑制血管内皮生长因子(VEGF)诱导的血管发生(1-5)。

[0377] 通过内皮出芽测定体外模拟血管发生。该系统包括内皮细胞迁移和增殖。Gen095是一种识别整联蛋白  $\alpha_v \beta_3$  和  $\alpha_v \beta_5$  的人单克隆抗体,这些整联蛋白调节内皮细胞迁移和增殖。因此,我们判断了 Gen095 是否能够抑制内皮细胞出芽。该实施例描述的实验证明 Gen095 抑制在纤维蛋白基质中生长的人上皮细胞出芽。

[0378] 材料

[0379] 从 R&D Systems (Minneapolis, MN) 获得人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF) 和人血管内皮生长因子 165(VEGF<sub>165</sub>)。一种抗  $\alpha_v \beta_3$  的单克隆抗体 1976Z/(LM609)、一种抗  $\alpha_v \beta_5$  的单克隆抗体 MAB 1961(PIF6) 购自于 Chemicon (Temecula, CA)。ReoPro 和 Gen095 从 Centocor 的临床药理和抗体技术系获得。人纤维蛋白原(无纤溶酶原, > 95%可凝蛋白)和牛皮肤明胶购自 Sigma (Saint Louis, MI)。

[0380] 细胞系

[0381] 人脐带静脉内皮细胞 Huvecs 购自 Clonetics (Walkersville, MA)。在含 10% FBS, 长 R 胰岛素样生长因子 1, 抗坏血酸, 氢化可的松, 人上皮生长因子, 人血管内皮生长因子, hFGF-b, 硫酸庆大霉素和两性霉素 B 的内皮基本培养基 (EBM) 试剂盒 (Clonetics) 中。在 37°C 和 CO<sub>2</sub> 中孵育细胞, 每 2-3 天更换培养基。只有 3-8 代用于所有实验中。

[0382] 基于纤维蛋白微载体的出芽测定

[0383] 用 Nehls 和 Drenkhahn 的改进方法(6)在基于三维纤维蛋白的基质中测定毛细管的形成。根据供应商的推荐制备明胶包被的 cytodex-3 微载体 (MCs, Sigma)。将新高

压灭菌的 MCs 悬浮于 EBM-2+20% FBS 中,并且以终浓度 40 细胞 /MC 加入细胞。37℃ 孵育 4 小时,允许细胞附着于 MCs。然后将 MCs 悬浮于大体积培养基中,在 37℃ 和 CO<sub>2</sub> 中孵育 2-4 天。偶尔搅拌 MCs 以防止细胞包被珠的聚集。将 MCs 包埋于按以下方法制备的纤维蛋白凝胶中:将人纤维蛋白原 (2mg/ml) 溶于普通的或含 bFGF 或血清的 EBM-2 培养基。该溶液也含有各种抗体。为防止由纤维蛋白包埋细胞进行的过度纤维蛋白裂解,向纤维蛋白原溶液中和生长培养基中加入 200U/ml 的抑肽酶。向纤维蛋白原溶液中加入密度为 100-200MCs/ml (50-100 个珠 / 每孔 -48 孔板) 的细胞包被的微载体,通过加入凝血酶 (0.5U/ml) 而诱导凝血。完成凝血后,向纤维蛋白基质中加入 0.5ml 溶液 (含上述所有成分,除去纤维蛋白原和凝血酶)。在 37℃ 和 CO<sub>2</sub> 中孵育板 1-3 天。1-3 天后,用溶于 PBS 的 3% 低聚甲醛固定凝胶,对长度超过 MC 珠直径 (150 μm) 的毛细血管芽的数目进行定量。

#### [0384] 结果和讨论

[0385] 在纤维蛋白凝胶中培养时 Huvecs 可以形成毛细血管样芽 (图 9)。内皮细胞迁移出凝胶包被的珠并延伸成线足。长芽由一些形成腔的细胞组成。该过程类似于体内微毛细血管形成,因为它涉及内皮细胞迁移、侵入和细胞增殖。芽形成的定量显示,Gen095 在 bFGF 或完全培养基中抑制内皮细胞芽形成 (图 10)。LM609 和 P1F6 的组合一般比 Gen095 更有效抑制出芽 (图 11)。

#### [0386] 结论

[0387] 从存在的血管形成新血管是血管发生的标志。可以通过内皮出芽测定体外模拟该过程。这些芽代表反应于 bFGF 等血管发生刺激或存在于血清中的各种刺激而形成的微毛细血管。Gen095 剂量依赖性地抑制 bFGF 和完全培养基刺激的内皮细胞出芽,这表示该抗体可以有效抑制  $\alpha_v\beta_3$  和  $\alpha_v\beta_5$  功能。目前还不知道为什么 Gen095 不如 LM609 和 P1F6 的组合有效,但可能 Gen095 分别与 LM609 和 P1F6 相比以更低的亲和性识别  $\alpha_v\beta_3$  和  $\alpha_v\beta_5$ 。这些数据集中起来证明 Gen095 可以抑制体外微毛细血管形成的复杂过程。

#### [0388] 参考文献

[0389] 1. Gastl G, Hermann T, Steurer M, Zmija J, Gunsilius E, Unger C, and Kraft A. 1997. Angiogenesis as a Target for Tumor Treatment. *Oncology* 54:177-184.

[0390] 2. Eliceiri BP, and Cheresh DA. 1999. The role of  $\alpha_V$  integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *The Journal of Clinical Investigation* 103:1227-1230.

[0391] 3. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, 1994. Integrin  $\alpha_v\beta_3$  antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79:1157-1164.

[0392] 4. Enenstein J, Walweh NS, and Kramer RH. 1992. Basic FGF and TGF- $\beta$  differentially modulate integrin expression of human microvascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 203:499-503.

[0393] 5. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, and Cheresh DA. 1995. Definition of two angiogenic pathways by distinct  $\alpha_V$  integrins. *Science* 270:1500-1502.

[0394] 6. Nehls, V and Drenckhahn, D. 1995. A novel, microcarrier-based in

vitroassay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cellmigration and angiogenesis. *Microvascular Res.* 50 :311-322.

[0395] 实施例 5 :双整联蛋白抗体对内皮和肿瘤细胞粘附、迁移和侵入的作用

[0396] 概要

[0397] 用人胎盘  $\alpha V\beta 3$  免疫含重链和轻链的人可变区和恒定区抗体转基因的 (CBA/J x C57/BL6/J) $F_2$  杂交小鼠 (1-4)。一次融合产生了完全的人  $\alpha V\beta 3$  反应性 IgG1  $\kappa$  单克隆抗体,即 Gen0.95。发现完全的人抗体都对  $\alpha V\beta 3$  和  $\alpha V\beta 5$  有反应性 (5)。这些整联蛋白参与内皮和肿瘤细胞粘附、迁移和侵入。因此,我们鉴定了 Gen0.95 对整联蛋白介导的细胞死亡率的作用。Gen095 抑制人脐带静脉内皮细胞 (HUVEC) 和人黑色素瘤细胞与玻连蛋白、变性胶原、纤维蛋白原和纤维蛋白的结合,但它不阻断细胞与纤连蛋白和 I 型胶原的粘附。Gen095 也抑制由碱性成纤维细胞生长因子和的剂量血清刺激的内皮细胞迁移。Gen095 抑制肿瘤细胞通过纤维蛋白凝胶侵入。总之,Gen095 在各种基于细胞的体外测定中功能性阻断  $\alpha V\beta 3$  和  $\alpha V\beta 5$ 。

[0398] 缩写

[0399] BSA- 牛血清白蛋白

[0400]  $CO_2$ - 二氧化碳

[0401] DMSO- 二甲基亚砷

[0402] FBS- 胎牛血清

[0403] Mab- 单克隆抗体

[0404] OD- 光密度

[0405] RT- 室温

[0406] HUVEC- 人脐带静脉内皮细胞

[0407] bFGF- 牛碱性成纤维细胞生长因子

[0408] 引言 :

[0409] 目前有足够的证据证明进展性的肿瘤生长依赖于血管发生,即新血管的形成。这些新血管的形成为肿瘤提供了营养和氧气,带走废物,并且作为肿瘤细胞转移至远处位点的导管。一些研究限定了整联蛋白在血管发生过程中的作用。整联蛋白是在细胞与细胞外基质 (ECM) 的粘附中起关键作用和介导细胞存活、迁移、和增殖中起重要作用的异二聚体跨膜蛋白 (6)。在血管发生过程中,  $\alpha V\beta 3$  和  $\alpha V\beta 5$  在激活的内皮细胞表面上调,这有助于这些细胞的迁移和增殖 (6)。抗  $\alpha V\beta 3$  抗体阻断碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 诱导的血管发生,而  $\alpha V\beta 5$  的特异性抗体抑制血管内皮生长因子 (VEGF) 诱导的血管发生 (6, 7)。除调节血管发生外,  $\alpha V\beta 3$  和  $\alpha V\beta 5$  调节肿瘤细胞粘附、迁移和侵入,这些是肿瘤细胞转移所需要的过程。以前的研究表明, Gen095 结合于纯化的  $\alpha V\beta 3$  和  $\alpha V\beta 5$  整联蛋白,因此,我们确定了该抗体是否从功能上阻断  $\alpha V\beta 3$  和  $\alpha V\beta 5$  介导的内皮和肿瘤细胞粘附、迁移和侵入。

[0410] 材料和方法

[0411] 材料

[0412] 从 R&D Systems (Minneapolis, MN) 获得人碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和人血管内皮生长因子 165 (VEGF165)。一种抗  $\alpha V\beta 3$  的单克隆抗体 1976Z/ (LM609)、一种



抗  $\alpha_V\beta_5$  的单克隆抗体 MAB 1961 (PIF6) 购自于 Chemicon (Temecula, CA)。ReoPro (批号: 94A04ZE) 和 Gen095 (批号: JG100899) 从 Centocor 的临床药理和抗体技术系获得。BIOCOAT 细胞培养插入物 (孔径:  $8\ \mu\text{m}$ ) 购自 Becton Dickinson (Bedford, MA)。Vybrant<sup>TM</sup> 细胞粘附测定试剂盒 (V-13181) 购自 Molecular Probes (Eugene, OR)。不含纤溶酶原的纤维蛋白酶 (VWF/ 去除 Fn) 购自 Enzyme Research Labs (South Bend, IN)。牛皮肤明胶购自 Sigma (Saint Louis, MI)。人玻连蛋白购自 Promega (Madison, WI), I 型胶原购自 GIBCO BRL (Gaithersburg, MD)。

#### [0413] 细胞系

[0414] 人脐带静脉内皮细胞 Huvecs 购自 Clonetics (Walkersville, MA)。在含 10% FBS, 长 R 胰岛素样生长因子 1, 抗坏血酸, 氢化可的松, 人上皮生长因子, 人血管内皮生长因子, hFGF-b, 硫酸庆大霉素和两性霉素 B 的内皮基本培养基 (EBM) 试剂盒 (Clonetics) 中。在 37°C 和 CO<sub>2</sub> 中孵育细胞, 每 2-3 天更换培养基。当细胞达到 80% 汇合时进行传代。只有 3-8 代用于所有实验中。

[0415] A375S2 细胞, 即一种表达  $\alpha_V\beta_3$  和  $\alpha_V\beta_5$  整联蛋白的人黑色素瘤细胞系获得自 Centocor 细胞库, 其中该细胞系视为不含支原体和细菌污染。在补加 10% FBS, 2mM L-谷氨酰胺, 1mM 丙酮酸钠和 0.1mM 非必需氨基酸的 DMEM 中培养这些细胞。

[0416] HT29 细胞获得自 Centocor 细胞生物服务系, 其中该细胞系视为不含支原体和细菌污染。在补加 10% FBS, 2mM L-谷氨酰胺, 1mM 丙酮酸钠和 0.1mM 非必需氨基酸的 DMEM 中培养这些细胞。

#### [0417] 流式细胞术

[0418] 为检测表面整联蛋白, 收获细胞, 洗涤, 悬浮于未补充的 RPMI 培养基, 然后用抗整联蛋白 mAb (10  $\mu\text{g/ml}$ ) 和 FITC 标记的山羊抗小鼠抗体 (1 : 100) 或 FITC 标记的抗整联蛋白抗体 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) 系列孵育 60 分钟。无第一抗体或用同种型匹配的抗体取代的第一抗体作为阴性对照。立即用 FACS Scan II 流式细胞仪 (Becton Dickinson, Mountain View, CA) 分析细胞。

#### [0419] 粘附分析

[0420] 用玻连蛋白 (1  $\mu\text{g/ml}$ ), 明胶 (0.1%), 纤维蛋白原 (100  $\mu\text{g/ml}$ ), I 型胶原 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) 或纤连蛋白 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) 在 4°C 下包被微量滴定板 (Linbro-Titertek, ICN Biomedicals, Inc)。使用前用 PBS 冲洗, 用 1% BSA/PBS (pH 7.4) 封闭 1 小时。纤维蛋白包被的微量滴定孔通过用凝血酶 (1U/ml) 处理纤维蛋白原而形成。根据生产商的说明用 Calcein AM 荧光染料 (Molecular Probes, Eugene, OR) 标记粘附的细胞 (HUVECS HT29 和 A375S. 2), 收获, 洗涤两次, 重悬于含 0.1% BSA 的 DMEM 培养基。将细胞密度调节至  $5 \times 10^5/\text{ml}$  后, 用各种浓度的抗体将细胞在 37°C 孵育 15 分钟。将细胞-抗体混合物加入孔 (100  $\mu\text{l}$ /孔), 在 37°C 孵育 1 小时。用 PBS 冲洗板两次, 以去除未结合细胞, 在 485-538nm 下, 在荧光板读数器 (Fluoroskan) 中测量粘附。细胞与 BSA 包被的板的粘附作为阴性对照。

#### [0421] 趋化性迁移测定

[0422] 在 24-Transwell 室中用聚苯乙烯膜 (直径 6.5mm, 厚 10  $\mu\text{m}$ , 孔径 8  $\mu\text{m}$ ) 中进行细胞迁移测定。用胰蛋白酶-EDTA 收获亚汇合的 24 小时细胞培养物 (HUVECS 或 A375S. 2), 洗涤两次, 重悬于其各自的含 0.1% BSA 的无血清培养基中。在抗体存在或不存在时将细胞

(100,000/500  $\mu$ l) 加入上面的室。为促进趋化性细胞迁移,将 750  $\mu$ l 含 0.1% BSA 和玻连蛋白 (2  $\mu$ g/ml) 或血清 (对于 HUVECS 为 2%, 对于 A375S2 细胞为 10%) 的培养基加入底部的室,将板置于组织培养孵育器中。4-8 小时后通过用棉线去除顶部的细胞而终止迁移,然后用 3% 低聚甲醛固定滤膜,用结晶紫染色。通过光学显微镜测定细胞迁移程度,用 Phase 3 图像分析软件 (Glen Mills, PA) 分析图像。该软件分析被染色细胞在滤膜底侧所占据的总面积,它与细胞迁移程度成正比。

#### [0423] 趋触性迁移测定

[0424] 用进行了微小改变的上述 transwell 室进行细胞迁移测定。简言之,用玻连蛋白 (2  $\mu$ g/ml) 将膜的下面室温下包被 60 分钟,然后在室温下用 1% BSA/PBS 溶液封闭 60 分钟。随后,用 PBS 洗涤膜并且空气中干燥。将含 0.1% BSA 和 bFGF (2  $\mu$ g/ml) 的无血清培养基 (750  $\mu$ l) 加入下面的室。用胰蛋白酶-EDTA 收获亚汇合的 24 小时细胞培养物,洗涤两次,重悬于无血清培养基中。在抗体存在或不存在时将细胞 (100,000/500  $\mu$ l) 加入上面的室。将室置于组织培养孵育器中,允许迁移进行 6 小时。按前述方法测定细胞迁移程度。

#### [0425] 侵入测定

[0426] 将纤维蛋白原 (不含纤溶酶原, 10mg/ml, 100  $\mu$ l) 和 100  $\mu$ l 的 IU/ml 凝血酶混合,立即加入 24 孔 transwell 板 (直径 6.5mm, 厚 10  $\mu$ m, 孔径 8  $\mu$ m, Costar) 的顶部室。将板在 37°C 孵育 30 分钟以形成纤维蛋白凝胶。用胰蛋白酶消化汇合的肿瘤细胞 (A375S. 2), 离心,重悬于补加 0.1% BSA 和 10g/ml 纤溶酶原 (Enzyme Research Labs, South Bend, IN) 和各种浓度抗体的基本培养基中,在室温下孵育 15 分钟。在抗体存在或不存在时将细胞 (100,000/500  $\mu$ l) 加入上面的室。侵入室的下隔室中充满 0.75ml 10% FBS-DMEM, 作为化学引诱物,将板转移至组织培养孵育器。24 小时后,通过用棉线去除顶部的细胞而终止迁移,然后用 3% 低聚甲醛固定滤膜,用结晶紫染色。通过光学显微镜测定细胞迁移程度,用上述 Phase 3 图像分析软件分析图像。

#### [0427] 结果和讨论

#### [0428] Gen095 抑制 $\alpha$ V $\beta$ 3 和 $\alpha$ V $\beta$ 5 介导的细胞粘附

[0429] 由于 Gen095 与  $\alpha$ V $\beta$ 3 和  $\alpha$ V $\beta$ 5 整联蛋白结合,我们测定了我们的肿瘤细胞 (A375S. 2 和 HT29) 和内皮细胞是否表达这些整联蛋白。流式细胞术表明, A375S. 2 和 HUVEC 表达  $\alpha$ V $\beta$ 3 和  $\alpha$ V $\beta$ 5 整联蛋白,但 HT29 细胞表达  $\alpha$ V $\beta$ 5, 而不表达  $\alpha$ V $\beta$ 3 整联蛋白 (图 12A-I)。

[0430] HT29 细胞 (12A, B 和 C) 在其表面表达  $\alpha$ V $\beta$ 5 整联蛋白,而不表达  $\alpha$ V $\beta$ 3 整联蛋白。HUVEC (12D, E 和 F 和 A375S. 2 (12G, H 和 I) 在其表面表达  $\alpha$ V $\beta$ 3 和  $\alpha$ V $\beta$ 5 整联蛋白。通过免疫荧光对肿瘤细胞和内皮细胞进行染色,通过流式细胞术进行分析。左侧的柱状图表示同种型匹配的抗体存在下的本底荧光。右侧的柱状图表示阳性染色。A, D, G, LM609 (针对 mAb 的  $\alpha$ V $\beta$ 3, 10  $\mu$ g/ml); B, E, H, PIF6 (针对 mAb 的  $\alpha$ V $\beta$ 5, 10  $\mu$ g/ml); 和 C, F, I, Gen095 (10  $\mu$ g/ml)。

[0431] 详细测定了 Gen095 对 HUVEC, A375S. 2 和 HT 29 细胞与各种基质蛋白粘附的作用。Gen095 完全抑制 HUVEC 和 A375S. 2 细胞与玻连蛋白包被的板的粘附,部分抑制与纤维蛋白原、明胶和纤维蛋白包被的板的粘附,表明该抗体可以阻断  $\alpha$ V $\beta$ 3 和  $\alpha$ V $\beta$ 5 (图 2 和 3, 表 1 和 2)。

[0432] (国际公开时缺页)

[0433] 表 5. A375S. 2 细胞与玻连蛋白、明胶、纤维蛋白原、纤维蛋白、纤连蛋白和 I 型胶原的粘附。各种浓度抗体存在下的细胞粘附程度表示为抗体不存在下细胞粘附的百分比, 抗体不存在下的细胞粘附作为 100%。每个数据点是三次测定的平均值 (+/-SD)。使用的抗体浓度是 10  $\mu$ g/ml。

[0434] 粘附 (%) +/-SD

[0435]

	玻连蛋白	明胶	纤维蛋白原	纤维蛋白	纤连蛋白	I型 胶原
人 IgG	104.0 $\pm$ 5.3	94.6 $\pm$ 12.4	102.5 $\pm$ 5.9	99.5 $\pm$ 4.0	100.0 $\pm$ 5.5	99.1 $\pm$ 3.3
LM609	42.1 $\pm$ 6.1	25.2 $\pm$ 7.1	14.0 $\pm$ 1.8	50.0 $\pm$ 1.9	104.0 $\pm$ 8.1	100.0 $\pm$ 1.5
PIF6	28.5 $\pm$ 3.8	87.4 $\pm$ 7.8	99.4 $\pm$ 3.6	92.9 $\pm$ 4.7	101.0 $\pm$ 5.7	101.0 $\pm$ 7.3
LM609- PIF6	0.9 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 1.5	10.3 $\pm$ 2.6	47.6 $\pm$ 3.2	109.0 $\pm$ 4.1	102.0 $\pm$ 4.6
Gen095	1.4 $\pm$ 0.4	23.2 $\pm$ 7.2	11.4 $\pm$ 2.8	43.3 $\pm$ 3.5	103.0 $\pm$ 4.5	104.0 $\pm$ 5.9
ReoPro	38.1 $\pm$ 0.7	6.0 $\pm$ 1.0	6.5 $\pm$ 2.1	12.9 $\pm$ 3.8	104.0 $\pm$ 5.6	93.1 $\pm$ 3.1

[0436] 人结肠癌 HT29 细胞与玻连蛋白的粘附。按上述方法进行粘附测定。与 BSA 包被的孔的细胞粘附作为阴性对照。图 15 的数据表示为最大结合 (不存在抗体) 的百分比, 是三次测定的平均值 (+/-SD)。

[0437] Gen095 阻断人黑色素瘤和内皮细胞迁移

[0438] 整联蛋白  $\alpha$ V $\beta$ 3 和  $\alpha$ V $\beta$ 5 参与细胞迁移, 因此我们测定了 Gen095 是否能够阻断玻连蛋白刺激的细胞迁移。玻连蛋白刺激的细胞迁移涉及  $\alpha$ V $\beta$ 3 和  $\alpha$ V $\beta$ 5。当玻连蛋白作为化学引诱物时, Gen095 剂量依赖性抑制内皮细胞迁移 (图 5 和 6)。有趣的是, Gen095 也抑制 HUVECS 和 A375S. 2 细胞对血清的迁移 (图 7-8)。这些发现对血管发生和肿瘤治疗可能是重要的, 因为它们提示 Gen095 的靶,  $\alpha$ V $\beta$ 3 和  $\alpha$ V $\beta$ 5 是由血清中的各种迁移因子激活的中枢受体。

[0439] HUVECS 向 2  $\mu$ g/ml 玻连蛋白的迁移。按方法中的描述进行测定, 允许细胞迁移 6 小时。光学显微镜照片是图 16A 无抗体, (16B), Gen095 (5  $\mu$ g/ml), (16C), Gen095 (40  $\mu$ g/ml) 的细胞迁移的代表性视野 (10 倍物镜)。图 16D 是各种浓度 Gen095 存在下的细胞迁移的表示图。数据标准化为对照 (无抗体) 的百分比, 对照认为是 100%, 每个点是三个 transwell 滤膜的平均值 (+/-SD)。

[0440] 在  $\alpha$ V $\beta$ 3 和  $\alpha$ V $\beta$ 5 的抗体存在下, HUVECS 向 2  $\mu$ g/ml 玻连蛋白迁移。按方法中的描述进行测定, 允许细胞迁移 6 小时。LM609 和 PIF6 分别针对  $\alpha$ V $\beta$ 3 和  $\alpha$ V $\beta$ 5。图 17 的数据标准化为对照 (无抗体) 的百分比, 对照认为是 100%, 每个柱是三个 transwell 滤膜的平均值 (+/-SD)。BSA、小鼠 IgG 和人 IgG 作为阴性对照。LM609-PIF6 表示两种抗体的组合。抗体和 BSA 的浓度为 10  $\mu$ g/ml。

[0441] HUVECS 向 2% FBS 的迁移。进行迁移测定 4 小时, 按方法中的描述获得数据。图

18(A) 表示 LM609, P1F6, LM609+P1F6 的组合, 同种型匹配的对照 (人和小鼠) 存在下的细胞迁移。抗体和蛋白的浓度为  $10 \mu\text{g/ml}$ 。图 8(B) 表示 ReoPro 和 Gen095 存在下的细胞迁移。光学显微镜照片是图 18(C) 无抗体, 18(D), Gen095 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ), 图 18(E), Gen095 ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) 的细胞迁移的代表性视野 (10 倍物镜)。数据标准化为对照 (无抗体) 的百分比, 对照认为是 100%, 每个点是三个 transwell 滤膜的平均值 (+/-SD)。

[0442] A375S. 2 向 10% FBS 的迁移。进行迁移测定 4 小时, 按方法中的描述获得数据。抗体的浓度为  $10 \mu\text{g/ml}$ 。图 19(A) 是各种浓度 Gen095 存在下细胞迁移的表示图。图 19(B) 表示 LM609, P1F6, LM609+P1F6 的组合, 同种型匹配的对照 (人和小鼠) 存在下的细胞迁移。数据标准化为对照 (无抗体) 的百分比, 对照认为是 100%, 每个点是三个 transwell 滤膜的平均值 (+/-SD)。光学显微镜照片是图 19(C) 无抗体, 18(D), Gen095 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ), 图 18(E), Gen095 ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) 的细胞迁移的代表性视野 (10 倍物镜)。

[0443] 上述结果表明, Gen095 阻断肿瘤和内皮细胞向玻连蛋白和血清迁移。接下来, 我们确定该抗体是否可以抑制 bFGF 刺激的细胞迁移。如图 9 所示, bFGF 刺激 HUVEC 细胞向玻连蛋白迁移, Gen095 显著阻断该被刺激的细胞迁移。

[0444] bFGF 存在下 HUVECS 向玻连蛋白的迁移。用  $2 \mu\text{g/ml}$  玻连蛋白包被迁移室滤膜的下面, 按方法中的描述进行测定。允许细胞迁移 6 小时。在图 20A-E 中, 每个数据点是三个 transwell 滤膜的平均值 (+/-SD)。图 20(A), bFGF; 图 20(B), Gen095 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ); 图 20(C), Gen095 ( $40 \mu\text{g/ml}$ ); 图 20(D), 无 bFGF。图 20(E), 图示了各种抗体存在下的细胞迁移的抑制。

[0445] Gen095 阻断人黑色素瘤细胞侵入

[0446] 上述结果表明, Gen095 可以抑制细胞粘附和迁移。因此, 我们考虑了该抗体是否阻断肿瘤细胞侵入, 即一个包括细胞粘附的多步过程, 基质的降解和细胞通过降解基质的迁移。我们选择了纤维蛋白作为肿瘤细胞的基质, 因为 Gen095 可以阻断肿瘤细胞与纤维蛋白粘附 (图 3)。如图 10 所示, LM609 可以抑制 A375S 侵入, 这表示至少  $\alpha V \beta 3$  参与此过程。Gen095 剂量依赖性抑制肿瘤细胞通过纤维蛋白。针对血小板 GPIIb/IIIa (10E5) 的不相关 IgG 和 mAb 作为阴性对照。综上所述, 这些数据表明, Gen095 有效阻断人黑色素瘤细胞侵入。

[0447] A375S. 2 细胞通过纤维蛋白凝胶 ( $5\text{mg/ml}$ ) 的侵入。允许侵入测定进行 24 小时, 按方法中的描述获取数据。光学显微镜照片是图 21(A) 无抗体, 21(B), Gen095 ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) 的细胞侵入的代表性视野 (4 倍物镜), 图 21(C) 和 (D) 是 Gen095, 10E5F(ab')<sub>2</sub>, LM609, P1F6, LM-PIF6 (LM609+P1F6), 人和小鼠 IgGs (H-IgG 和 M-IgG) 存在下的细胞侵入的表示图。图 21(D): 所有抗体和蛋白的浓度是  $10 \mu\text{g/ml}$ 。数据标准化为对照 (无抗体) 的百分比, 对照认为是 100%, 每个点是三个 transwell 滤膜的平均值 (+/-SD)。

[0448] 结论

[0449] 细胞粘附、迁移和侵入要求整联蛋白如  $\alpha V \beta 3$  和  $\alpha V \beta 5$ 。Gen095 能够功能性阻断由内皮细胞和肿瘤细胞表达的  $\alpha V \beta 3$  和  $\alpha V \beta 5$ 。Gen095 能够阻断由 bFGF 或血清刺激的迁移和侵入。这些结果表明, Gen095 是肿瘤和内皮细胞表达的  $\alpha V \beta 3$  和  $\alpha V \beta 5$  的强抑制剂。

[0450] 参考文献

[0451] 1. Taylor, L. D. , C. E. Carmack, D. Huszar, K. M. Higgins, R. Mashayekh, G. Sequar, S. R. Schramm, C-C. Kuo, S. L. O' Donnell, R. M. Kay, C. S. Woodhouse, and N. Lonberg. 1993. Human immunoglobulin transgenes undergo rearrangement, somatic mutation and class switching in mice that lack endogenous IgM. *International Immunology* 6 : 579-591.

[0452] 2. Lonberg, N. , L. D. Taylor, F. A. Harding, M. Trounstein, K. M. Higgins, S. R. Schramm, C-C. Kuo, R. Mashayekh, K. Wymore, J. G. McCabe, D. Munoz-O' Regan, S. L. O' Donnell, E. S. G. Lapachet, T. Bengoechea, D. M. Fishwild, C. E. Carmack, R. M. Kay, and D. Huszar. 1994. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 368 :856-859.

[0453] 3. Neuberger, M. 1996. Generating high-avidity human Mabs in mice. *Nature Biotechnology* 14 :826.

[0454] 4. Fishwild, D. M. , S. L. O' Donnell, T. Bengoechea, D. V. Hudson, F. Harding, S. L. Bernhard, D. Jones, R. M. Kay, K. M. Higgins, S. R. Schramm, and N. Lonberg. 1996. High-avidity human IgG monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nature Biotechnology* 14 :845-851.

[0455] 5. Gastl, G. , T. Hermann, M. Steurer, J. Zmija, E. Gunsilius, C. Unger, and A. Kraft. 1997. Angiogenesis as a Target for Tumor Treatment. *Oncology* 54 :177-184.

[0456] 6. Eliceiri, B. P. , and D. A. Cheresh. 1999. The role of  $\alpha V$  integrins during angiogenesis : insights into potential mechanisms of action and clinical development. *The Journal of Clinical Investigation* 103 :1227-1230.

[0457] 7. Friedlander M. , P. C. Brooks, R. W. Shaffer, C. M. Kincaid, J. A. Vamer, and D. A. Cheresh. 1995. Definition of two angiogenic pathways by distinct  $\alpha V$  integrins. *Science* 270 :1500-1502.

[0458] 应该明确的是,本发明的实施可以不限于前面说明书和实施例的具体描述。

[0459] 根据前面的教导,可以对本发明进行各种修饰和变化,它们都属于所附权利要求的范围。

[0460] 序列表

[0461] <110>J. 吉勒斯-科马尔 ;G. 希夫纳 ;L. 斯奈德 ;M. 特里克哈

[0462] <120>抗双整联蛋白抗体、组合物、方法和用途

[0463] <130>CEN 249

[0464] <160>17

[0465] <170>PatentIn Ver 2.0

[0466] <210>1

[0467] <211>5

[0468] <212>PRT

[0469] <213>人 (Homo sapiens)

[0470] <400>1

[0471] Arg Tyr Thr Met His

[0472]		5		
[0473]	<210>2			
[0474]	<211>17			
[0475]	<212>PRT			
[0476]	<213> 人			
[0477]	<400>2			
[0478]	Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly			
[0479]	1	5	10	15
[0480]	<210>3			
[0481]	<211>10			
[0482]	<212>PRT			
[0483]	<213> 人			
[0484]	<400>3			
[0485]	Glu Ala Arg Gly Ser Tyr Ala Phe Asp Ile			
[0486]	1	5	10	
[0487]	<210>4			
[0488]	<211>10			
[0489]	<212>PRT			
[0490]	<213> 人			
[0491]	<400>4			
[0492]	Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala			
[0493]	1	5	10	
[0494]	<210>5			
[0495]	<211>6			
[0496]	<212>PRT			
[0497]	<213> 人			
[0498]	<400>5			
[0499]	Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr			
[0500]	1	5		
[0501]	<210>6			
[0502]	<211>7			
[0503]	<212>PRT			
[0504]	<213> 人			
[0505]	<400>6			
[0506]	Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro			
[0507]	1	5		
[0508]	<210>7			
[0509]	<211>119			
[0510]	<212>PRT			

[0511] <213>人  
 [0512] <400>7  
 [0513] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 [0514] 1 5 10 15  
 [0515] Ser Arg Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr  
 [0516] 20 25 30  
 [0517] Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 [0518] 35 40 45  
 [0519] Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
 [0520] 50 55 60  
 [0521] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr  
 [0522] 65 70 75 80  
 [0523] Leu Gln Val Asn Ile Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0524] 85 90 95  
 [0525] Ala Arg Glu Ala Arg Gly Ser Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
 [0526] 100 105 110  
 [0527] Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 [0528] 115  
 [0529] <210>8  
 [0530] <211>108  
 [0531] <212>PRT  
 [0532] <213>人  
 [0533] <400>8  
 [0534] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 [0535] 1 5 10 15  
 [0536] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 [0537] 20 25 30  
 [0538] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 [0539] 35 40 45  
 [0540] Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 [0541] 50 55 60  
 [0542] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 [0543] 65 70 75 80  
 [0544] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro  
 [0545] 85 90 95  
 [0546] Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
 [0547] 100 105  
 [0548] <210>9  
 [0549] <211>1048

[0550] <212>PRT  
 [0551] <213>人  
 [0552] <400>9  
 [0553] Met Ala Phe Pro Pro Arg Arg Arg Leu Arg Leu Gly Pro Arg Gly Leu  
 [0554] 1 5 10 15  
 [0555] Pro Leu Leu Leu Ser Gly Leu Leu Leu Pro Leu Cys Arg Ala Phe Asn  
 [0556] 20 25 30  
 [0557] Leu Asp Val Asp Ser Pro Ala Glu Tyr Ser Gly Pro Glu Gly Ser Tyr  
 [0558] 35 40 45  
 [0559] Phe Gly Phe Ala Val Asp Phe Phe Val Pro Ser Ala Ser Ser Arg Met  
 [0560] 50 55 60  
 [0561] Phe Leu Leu Val Gly Ala Pro Lys Ala Asn Thr Thr Gln Pro Gly Ile  
 [0562] 65 70 75 80  
 [0563] Val Glu Gly Gly Gln Val Leu Lys Cys Asp Trp Ser Ser Thr Arg Arg  
 [0564] 85 90 95  
 [0565] Cys Gln Pro Ile Glu Phe Asp Ala Thr Gly Asn Arg Asp Tyr Ala Lys  
 [0566] 100 105 110  
 [0567] Asp Asp Pro Leu Glu Phe Lys Ser His Gln Trp Phe Gly Ala Ser Val  
 [0568] 115 120 125  
 [0569] Arg Ser Lys Gln Asp Lys Ile Leu Ala Cys Ala Pro Leu Tyr His Trp  
 [0570] 130 135 140  
 [0571] Arg Thr Glu Met Lys Gln Glu Arg Glu Pro Val Gly Thr Cys Phe Leu  
 [0572] 145 150 155 160  
 [0573] Gln Asp Gly Thr Lys Thr Val Glu Tyr Ala Pro Cys Arg Ser Gln Asp  
 [0574] 165 170 175  
 [0575] Ile Asp Ala Asp Gly Gln Gly Phe Cys Gln Gly Gly Phe Ser Ile Asp  
 [0576] 180 185 190  
 [0577] Phe Thr Lys Ala Asp Arg Val Leu Leu Gly Gly Pro Gly Ser Phe Tyr  
 [0578] 195 200 205  
 [0579] Trp Gln Gly Gln Leu Ile Ser Asp Gln Val Ala Glu Ile Val Ser Lys  
 [0580] 210 215 220  
 [0581] Tyr Asp Pro Asn Val Tyr Ser Ile Tys Tyr Asn Asn Gln Leu Ala Thr  
 [0582] 225 230 235 240  
 [0583] Arg Thr Ala Gln Ala Ile Phe Asp Asp Ser Tyr Leu Gly Tyr Ser Val  
 [0584] 245 250 255  
 [0585] Ala Val Gly Asp Phe Asn Gly Asp Gly Ile Asp Asp Phe Val Ser Gly  
 [0586] 260 265 270  
 [0587] Val Pro Arg Ala Ala Arg Thr Leu Gly Met Val Tyr Ile Tyr Asp Gly  
 [0588] 275 280 285



[0589]	Lys Asn Met Ser Ser Leu Tyr Asn Phe Thr Gly Glu Gln Met Ala Ala
[0590]	290 295 300
[0591]	Tyr Phe Gly Phe Ser Val Ala Ala Thr Asp Ile Asn Gly Asp Asp Tyr
[0592]	305 310 315 320
[0593]	Ala Asp Val Phe Ile Gly Ala Pro Leu Phe Met Asp Arg Gly Ser Asp
[0594]	325 330 335
[0595]	Gly Lys Leu Gln Glu Val Gly Gln Val Ser Val Ser Leu Gln Arg Ala
[0596]	340 345 350
[0597]	Ser Gly Asp Phe Gln Thr Thr Lys Leu Asn Gly Phe Glu Val Phe Ala
[0598]	355 360 365
[0599]	Arg Phe Gly Ser Ala Ile Ala Pro Leu Gly Asp Leu Asp Gln Asp Gly
[0600]	370 375 380
[0601]	Phe Asn Asp Ile Ala Ile Ala Ala Pro Tyr Gly Gly Glu Asp Lys Lys
[0602]	385 390 395 400
[0603]	Gly Ile Val Tyr Ile Phe Asn Gly Arg Ser Thr Gly Leu Asn Ala Val
[0604]	405 410 415
[0605]	Pro Ser Gln Ile Leu Glu Gly Gln Trp Ala Ala Arg Ser Met Pro Pro
[0606]	420 425 430
[0607]	Ser Phe Gly Tyr Ser Met Lys Gly Ala Thr Asp Ile Asp Lys Asn Gly
[0608]	435 440 445
[0609]	Tyr Pro Asp Leu Ile Val Gly Ala Phe Gly Val Asp Arg Ala Ile Leu
[0610]	450 455 460
[0611]	Tyr Arg Ala Arg Pro Val Ile Thr Val Asn Ala Gly Leu Glu Val Tyr
[0612]	465 470 475 480
[0613]	Pro Ser Ile Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr Cys Ser Leu Pro Gly Thr
[0614]	485 490 495
[0615]	Ala Leu Lys Val Ser Cys Phe Asn Val Arg Phe Cys Leu Lys Ala Asp
[0616]	500 505 510
[0617]	Gly Lys Gly Val Leu Pro Arg Lys Leu Asn Phe Gln Val Glu Leu Leu
[0618]	515 520 525
[0619]	Leu Asp Lys Leu Lys Gln Lys Gly Ala Ile Arg Arg Ala Leu Phe Leu
[0620]	530 535 540
[0621]	Tyr Ser Arg Ser Pro Ser His Ser Lys Asn Met Thr Ile Ser Arg Gly
[0622]	545 550 555 560
[0623]	Gly Leu Met Gln Cys Glu Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Arg Asp Glu Ser
[0624]	565 570 575
[0625]	Glu Phe Arg Asp Lys Leu Thr Pro Ile Thr Ile Phe Met Glu Tyr Arg
[0626]	580 585 590
[0627]	Leu Asp Tyr Arg Thr Ala Ala Asp Thr Thr Gly Leu Gln Pro Ile Leu

[0628]	595	600	605
[0629]	Asn Gln Phe Thr Pro Ala Asn Ile Ser Arg Gln Ala His Ile Leu Leu		
[0630]	610	615	620
[0631]	Asp Cys Gly Glu Asp Asn Val Cys Lys Pro Lys Leu Glu Val Ser Val		
[0632]	625	630	635
[0633]	Asp Ser Asp Gln Lys Lys Ile Tyr Ile Gly Asp Asp Asn Pro Leu Thr		
[0634]	645	650	655
[0635]	Leu Ile Val Lys Ala Gln Asn Gln Gly Glu Gly Ala Tyr Glu Ala Glu		
[0636]	660	665	670
[0637]	Leu Ile Val Ser Ile Pro Leu Gln Ala Asp Phe Ile Gly Val Val Arg		
[0638]	675	680	685
[0639]	Asn Asn Glu Ala Leu Ala Arg Leu Ser Cys Ala Phe Lys Thr Glu Asn		
[0640]	690	695	700
[0641]	Gln Thr Arg Gln Val Val Cys Asp Leu Gly Asn Pro Met Lys Ala Gly		
[0642]	705	710	715
[0643]	Thr Gln Leu Leu Ala Gly Leu Arg Phe Ser Val His Gln Gln Ser Glu		
[0644]	725	730	735
[0645]	Met Asp Thr Ser Val Lys Phe Asp Leu Gln Ile Gln Ser Ser Asn Leu		
[0646]	740	745	750
[0647]	Phe Asp Lys Val Ser Pro Val Val Ser His Lys Val Asp Leu Ala Val		
[0648]	755	760	765
[0649]	Leu Ala Ala Val Glu Ile Arg Gly Val Ser Ser Pro Asp His Ile Phe		
[0650]	770	775	780
[0651]	Leu Pro Ile Pro Asn Trp Glu His Lys Glu Asn Pro Glu Thr Glu Glu		
[0652]	785	790	795
[0653]	Asp Val Gly Pro Val Val Gln His Ile Tyr Glu Leu Arg Asn Asn Gly		
[0654]	805	810	815
[0655]	Pro Ser Ser Phe Ser Lys Ala Met Leu His Leu Gln Trp Pro Tyr Lys		
[0656]	820	825	830
[0657]	Tyr Asn Asn Asn Thr Leu Leu Tyr Ile Leu His Tyr Asp Ile Asp Gly		
[0658]	835	840	845
[0659]	Pro Met Asn Cys Thr Ser Asp Met Glu Ile Asn Pro Leu Arg Ile Lys		
[0660]	850	855	860
[0661]	Ile Ser Ser Leu Gln Thr Thr Glu Lys Asn Asp Thr Val Ala Gly Gln		
[0662]	865	870	875
[0663]	Gly Glu Arg Asp His Leu Ile Thr Lys Arg Asp Leu Ala Leu Ser Glu		
[0664]	885	890	895
[0665]	Gly Asp Ile His Thr Leu Gly Cys Gly Val Ala Gln Cys Leu Lys Ile		
[0666]	900	905	910

[0667]	Val Cys Gln Val Gly Arg Leu Asp Arg Gly Lys Ser Ala Ile Leu Tyr	
[0668]	915	920 925
[0669]	Val Lys Ser Leu Leu Trp Thr Glu Thr Phe Met Asn Lys Glu Asn Gln	
[0670]	930	935 940
[0671]	Asn His Ser Tyr Ser Leu Lys Ser Ser Ala Ser Phe Asn Val Ile Glu	
[0672]	945	950 955 960
[0673]	Phe Pro Tyr Lys Asn Leu Pro Ile Glu Asp Ile Thr Asn Ser Thr Leu	
[0674]	965	970 975
[0675]	Val Thr Thr Asn Val Thr Trp Gly Ile Gln Pro Ala Pro Met Pro Val	
[0676]	980	985 990
[0677]	Pro Val Trp Val Ile Ile Leu Ala Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Leu	
[0678]	995	1000 1005
[0679]	Ala Val Leu Val Phe Val Met Tyr Arg Met Gly Phe Phe Lys Arg Val	
[0680]	1010	1015 1020
[0681]	Arg Pro Pro Gln Glu Glu Gln Glu Arg Glu Gln Leu Gln Pro His Glu	
[0682]	1025	1030 1035 1040
[0683]	Asn Gly Glu Gly Asn Ser Glu Thr	
[0684]	1045	
[0685]	<210>10	
[0686]	<211>15	
[0687]	<212>DNA	
[0688]	<213>人	
[0689]	<400>10	
[0690]	agatatacta tgcaac	15
[0691]	<210>11	
[0692]	<211>51	
[0693]	<212>DNA	
[0694]	<213>人	
[0695]	<400>11	
[0696]	gttatatcat ttgatggaagcaataaatac tacgtagact ccgtgaaggg c	51
[0697]	<210>12	
[0698]	<211>30	
[0699]	<212>DNA	
[0700]	<213>人	
[0701]	<400>12	
[0702]	gaggccccggg gatcgtatgcttttgatatac	30
[0703]	<210>13	
[0704]	<211>33	
[0705]	<212>DNA	



[0745]	145	150	155	160
[0746]	Gly Thr Lys Leu Ala Thr Gln Met Arg Lys Leu Thr Ser Asn Leu Arg			
[0747]		165	170	175
[0748]	Ile Gly Phe Gly Ala Phe Val Asp Lys Pro Val Ser Pro Tyr Met Tyr			
[0749]		180	185	190
[0750]	Ile Ser Pro Pro Glu Ala Leu Glu Asn Pro Cys Tyr Asp Met Lys Thr			
[0751]		195	200	205
[0752]	Thr Cys Leu Pro Met Phe Gly Tyr Lys His Val Leu Thr Leu Thr Asp			
[0753]		210	215	220
[0754]	Gln Val Thr Arg Phe Asn Glu Glu Val Lys Lys Gln Ser Val Ser Arg			
[0755]		225	230	235
[0756]	Asn Arg Asp Ala Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met Gln Ala Thr			
[0757]		245	250	255
[0758]	Val Cys Asp Glu Lys Ile Gly Trp Arg Asn Asp Ala Ser His Leu Leu			
[0759]		260	265	270
[0760]	Val Phe Thr Thr Asp Ala Lys Thr His Ile Ala Leu Asp Gly Arg Leu			
[0761]		275	280	285
[0762]	Ala Gly Ile Val Gln Pro Asn Asp Gly Gln Cys His Val Gly Ser Asp			
[0763]		290	295	300
[0764]	Asn His Tyr Ser Ala Ser Thr Thr Met Asp Tyr Pro Ser Leu Gly Leu			
[0765]		305	310	315
[0766]	Met Thr Glu Lys Leu Ser Gln Lys Asn Ile Asn Leu Ile Phe Ala Val			
[0767]		325	330	335
[0768]	Thr Glu Asn Val Val Asn Leu Tyr Gln Asn Tyr Ser Glu Leu Ile Pro			
[0769]		340	345	350
[0770]	Gly Thr Thr Val Gly Val Leu Ser Met Asp Ser Ser Asn Val Leu Gln			
[0771]		355	360	365
[0772]	Leu Ile Val Asp Ala Tyr Gly Lys Ile Arg Ser Lys Val Glu Leu Glu			
[0773]		370	375	380
[0774]	Val Arg Asp Leu Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Phe Asn Ala Thr Cys			
[0775]		385	390	395
[0776]	Leu Asn Asn Glu Val Ile Pro Gly Leu Lys Ser Cys Met Gly Leu Lys			
[0777]		405	410	415
[0778]	Ile Gly Asp Thr Val Ser Phe Ser Ile Glu Ala Lys Val Arg Gly Cys			
[0779]		420	425	430
[0780]	Pro Gln Glu Lys Glu Lys Ser Phe Thr Ile Lys Pro Val Gly Phe Lys			
[0781]		435	440	445
[0782]	Asp Ser Leu Ile Val Gln Val Thr Phe Asp Cys Asp Cys Ala Cys Gln			
[0783]		450	455	460

[0784]	Ala Gln Ala Glu Pro Asn Ser His Arg Cys Asn Asn Gly Asn Gly Thr
[0785]	465 470 475 480
[0786]	Phe Glu Cys Gly Val Cys Arg Cys Gly Pro Gly Trp Leu Gly Ser Gln
[0787]	485 490 495
[0788]	Cys Glu Cys Ser Glu Glu Asp Tyr Arg Pro Ser Gln Gln Asp Glu Cys
[0789]	500 505 510
[0790]	Ser Pro Arg Glu Gly Gln Pro Val Cys Ser Gln Arg Gly Glu Cys Leu
[0791]	515 520 525
[0792]	Cys Gly Gln Cys Val Cys His Ser Ser Asp Phe Gly Lys Ile Thr Gly
[0793]	530 535 540
[0794]	Lys Tyr Cys Glu Cys Asp Asp Phe Ser Cys Val Arg Tyr Lys Gly Glu
[0795]	545 550 555 560
[0796]	Met Cys Ser Gly His Gly Gln Cys Ser Cys Gly Asp Cys Leu Cys Asp
[0797]	565 570 575
[0798]	Ser Asp Trp Thr Gly Tyr Tyr Cys Asn Cys Thr Thr Arg Thr Asp Thr
[0799]	580 585 590
[0800]	Cys Met Ser Ser Asn Gly Leu Leu Cys Ser Gly Arg Gly Lys Cys Glu
[0801]	595 600 605
[0802]	Cys Gly Ser Cys Val Cys Ile Gln Pro Gly Ser Tyr Gly Asp Thr Cys
[0803]	610 615 620
[0804]	Glu Lys Cys Pro Thr Cys Pro Asp Ala Cys Thr Phe Lys Lys Glu Cys
[0805]	625 630 635 640
[0806]	Val Glu Cys Lys Lys Phe Asp Arg Glu Pro Tyr Met Thr Glu Asn Thr
[0807]	645 650 655
[0808]	Cys Asn Arg Tyr Cys Arg Asp Glu Ile Glu Ser Val Lys Glu Leu Lys
[0809]	660 665 670
[0810]	Asp Thr Gly Lys Asp Ala Val Asn Cys Thr Tyr Lys Asn Glu Asp Asp
[0811]	675 680 685
[0812]	Cys Val Val Arg Phe Gln Tyr Tyr Glu Asp Ser Ser Gly Lys Ser Ile
[0813]	690 695 700
[0814]	Leu Tyr Val Val Glu Glu Pro Glu Cys Pro Lys Gly Pro Asp Ile Leu
[0815]	705 710 715 720
[0816]	Val Val Leu Leu Ser Val Met Gly Ala Ile Leu Leu Ile Gly Leu Ala
[0817]	725 730 735
[0818]	Ala Leu Leu Ile Trp Lys Leu Leu Ile Thr Ile His Asp Arg Lys Glu
[0819]	740 745 750
[0820]	Phe Ala Lys Phe Glu Glu Glu Arg Ala Arg Ala Lys Trp Asp Thr Ala
[0821]	755 760 765
[0822]	Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr

[0823]	770	775	780
[0824]	Tyr Arg Gly Thr		
[0825]	785		
[0826]	<210>17		
[0827]	<211>799		
[0828]	<212>PRT		
[0829]	<213>人		
[0830]	<400>17		
[0831]	Met Pro Arg Ala Pro Ala Pro Leu Tyr Ala Cys Leu Leu Gly Leu Cys		
[0832]	1	5	10 15
[0833]	Ala Leu Leu Pro Arg Leu Ala Gly Leu Asn Ile Cys Thr Ser Gly Ser		
[0834]	20	25	30
[0835]	Ala Thr Ser Cys Glu Glu Cys Leu Leu Ile His Pro Lys Cys Ala Trp		
[0836]	35	40	45
[0837]	Cys Ser Lys Glu Asp Phe Gly Ser Pro Arg Ser Ile Thr Ser Arg Cys		
[0838]	50	55	60
[0839]	Asp Leu Arg Ala Asn Leu Val Lys Asn Gly Cys Gly Gly Glu Ile Glu		
[0840]	65	70	75 80
[0841]	Ser Pro Ala Ser Ser Phe His Val Leu Arg Ser Leu Pro Leu Ser Ser		
[0842]	85	90	95
[0843]	Lys Gly Ser Gly Ser Ala Gly Trp Asp Val Ile Gln Met Thr Pro Gln		
[0844]	100	105	110
[0845]	Glu Ile Ala Val Asn Leu Arg Pro Gly Asp Lys Thr Thr Phe Gln Leu		
[0846]	115	120	125
[0847]	Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu Met		
[0848]	130	135	140
[0849]	Asp Leu Ser Leu Ser Met Lys Asp Asp Leu Asp Asn Ile Arg Ser Leu		
[0850]	145	150	155 160
[0851]	Gly Thr Lys Leu Ala Glu Glu Met Arg Lys Leu Thr Ser Asn Phe Arg		
[0852]	165	170	175
[0853]	Leu Gly Phe Gly Ser Phe Val Asp Lys Asp Ile Ser Pro Phe Ser Tyr		
[0854]	180	185	190
[0855]	Thr Ala Pro Arg Tyr Gln Thr Asn Pro Cys Ile Gly Tyr Lys Leu Phe		
[0856]	195	200	205
[0857]	Pro Asn Cys Val Pro Ser Phe Gly Phe Arg His Leu Leu Pro Leu Thr		
[0858]	210	215	220
[0859]	Asp Arg Val Asp Ser Phe Asn Glu Glu Val Arg Lys Gln Arg Val Ser		
[0860]	225	230	235 240
[0861]	Arg Asn Arg Asp Ala Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Val Leu Gln Ala		

[0862]		245		250		255
[0863]	Ala Val Cys Lys Glu Lys Ile Gly Trp Arg Lys Asp Ala Leu His Leu					
[0864]		260		265		270
[0865]	Leu Val Phe Thr Thr Asp Asp Val Pro His Ile Ala Leu Asp Gly Lys					
[0866]		275		280		285
[0867]	Leu Gly Gly Leu Val Gln Pro His Asp Gly Gln Cys His Leu Asn Glu					
[0868]		290		295		300
[0869]	Ala Asn Glu Tyr Thr Ala Ser Asn Gln Met Asp Tyr Pro Ser Leu Ala					
[0870]	305		310		315	320
[0871]	Leu Leu Gly Glu Lys Leu Ala Glu Asn Asn Ile Asn Leu Ile Phe Ala					
[0872]		325		330		335
[0873]	Val Thr Lys Asn His Tyr Met Leu Tyr Lys Asn Phe Thr Ala Leu Ile					
[0874]		340		345		350
[0875]	Pro Gly Thr Thr Val Glu Ile Leu Asp Gly Asp Ser Lys Asn Ile Ile					
[0876]		355		360		365
[0877]	Gln Leu Ile Ile Asn Ala Tyr Asn Ser Ile Arg Ser Lys Val Glu Leu					
[0878]		370		375		380
[0879]	Ser Val Trp Asp Gln Pro Glu Asp Leu Asn Leu Phe Phe Thr Ala Thr					
[0880]	385		390		395	400
[0881]	Cys Gln Asp Gly Val Ser Tyr Pro Gly Gln Arg Lys Cys Glu Gly Leu					
[0882]		405		410		415
[0883]	Lys Ile Gly Asp Thr Ala Ser Phe Glu Val Ser Leu Glu Ala Arg Ser					
[0884]		420		425		430
[0885]	Cys Pro Ser Arg His Thr Glu His Val Phe Ala Leu Arg Pro Val Gly					
[0886]		435		440		445
[0887]	Phe Arg Asp Ser Leu Glu Val Gly Val Thr Tyr Asn Cys Thr Cys Gly					
[0888]		450		455		460
[0889]	Cys Ser Val Gly Leu Glu Pro Asn Ser Ala Arg Cys Asn Gly Ser Gly					
[0890]	465		470		475	480
[0891]	Thr Tyr Val Cys Gly Leu Cys Glu Cys Ser Pro Gly Tyr Leu Gly Thr					
[0892]		485		490		495
[0893]	Arg Cys Glu Cys Gln Asp Gly Glu Asn Gln Ser Val Tyr Gln Asn Leu					
[0894]		500		505		510
[0895]	Cys Arg Glu Ala Glu Gly Lys Pro Leu Cys Ser Gly Arg Gly Asp Cys					
[0896]		515		520		525
[0897]	Ser Cys Asn Gln Cys Ser Cys Phe Glu Ser Glu Phe Gly Lys Ile Tyr					
[0898]		530		535		540
[0899]	Gly Pro Phe Cys Glu Cys Asp Asn Phe Ser Cys Ala Arg Asn Lys Gly					
[0900]	545		550		555	560



[0901]	Val Leu Cys Ser Gly His Gly Glu Cys His Cys Gly Glu Cys Lys Cys
[0902]	565 570 575
[0903]	His Ala Gly Tyr Ile Gly Asp Asn Cys Asn Cys Ser Thr Asp Ile Ser
[0904]	580 585 590
[0905]	Thr Cys Arg Gly Arg Asp Gly Gln Ile Cys Ser Glu Arg Gly His Cys
[0906]	595 600 605
[0907]	Leu Cys Gly Gln Cys Gln Cys Thr Glu Pro Gly Ala Phe Gly Glu Met
[0908]	610 615 620
[0909]	Cys Glu Lys Cys Pro Thr Cys Pro Asp Ala Cys Ser Thr Lys Arg Asp
[0910]	625 630 635 640
[0911]	Cys Val Glu Cys Pro Leu Leu His Ser Gly Lys Pro Asp Asn Gln Thr
[0912]	645 650 655
[0913]	Cys His Ser Leu Cys Arg Asp Glu Val Ile Thr Trp Val Asp Thr Ile
[0914]	660 665 670
[0915]	Val Lys Asp Asp Gln Glu Ala Val Leu Cys Phe Tyr Lys Thr Ala Lys
[0916]	675 680 685
[0917]	Asp Cys Val Met Met Phe Thr Tyr Val Glu Leu Pro Ser Gly Lys Ser
[0918]	690 695 700
[0919]	Asn Leu Thr Val Leu Arg Glu Pro Glu Cys Gly Asn Thr Pro Asn Ala
[0920]	705 710 715 720
[0921]	Met Thr Ile Leu Leu Ala Val Val Gly Ser Ile Leu Leu Val Gly Leu
[0922]	725 730 735
[0923]	Ala Leu Leu Ala Ile Trp Lys Leu Leu Val Thr Ile His Asp Arg Arg
[0924]	740 745 750
[0925]	Glu Phe Ala Lys Phe Gln Ser Glu Arg Ser Arg Ala Arg Tyr Glu Met
[0926]	755 760 765
[0927]	Ala Ser Asn Pro Leu Tyr Arg Lys Pro Ile Ser Thr His Thr Val Asp
[0928]	770 775 780
[0929]	Phe Thr Phe Asn Lys Phe Asn Lys Ser Tyr Asn Gly Thr Val Asp
[0930]	785 790 795

GenPharm Mabs 与  $\alpha$ VP3 的结合

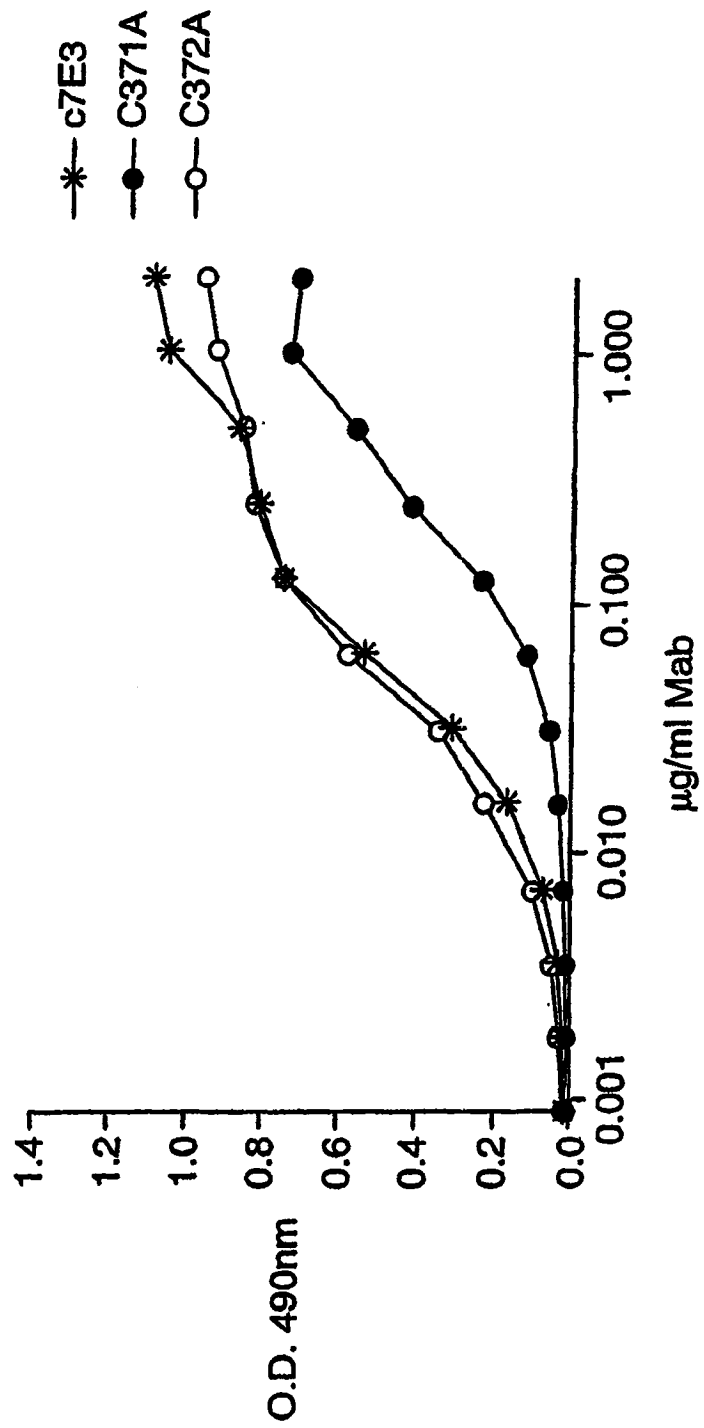


图 1

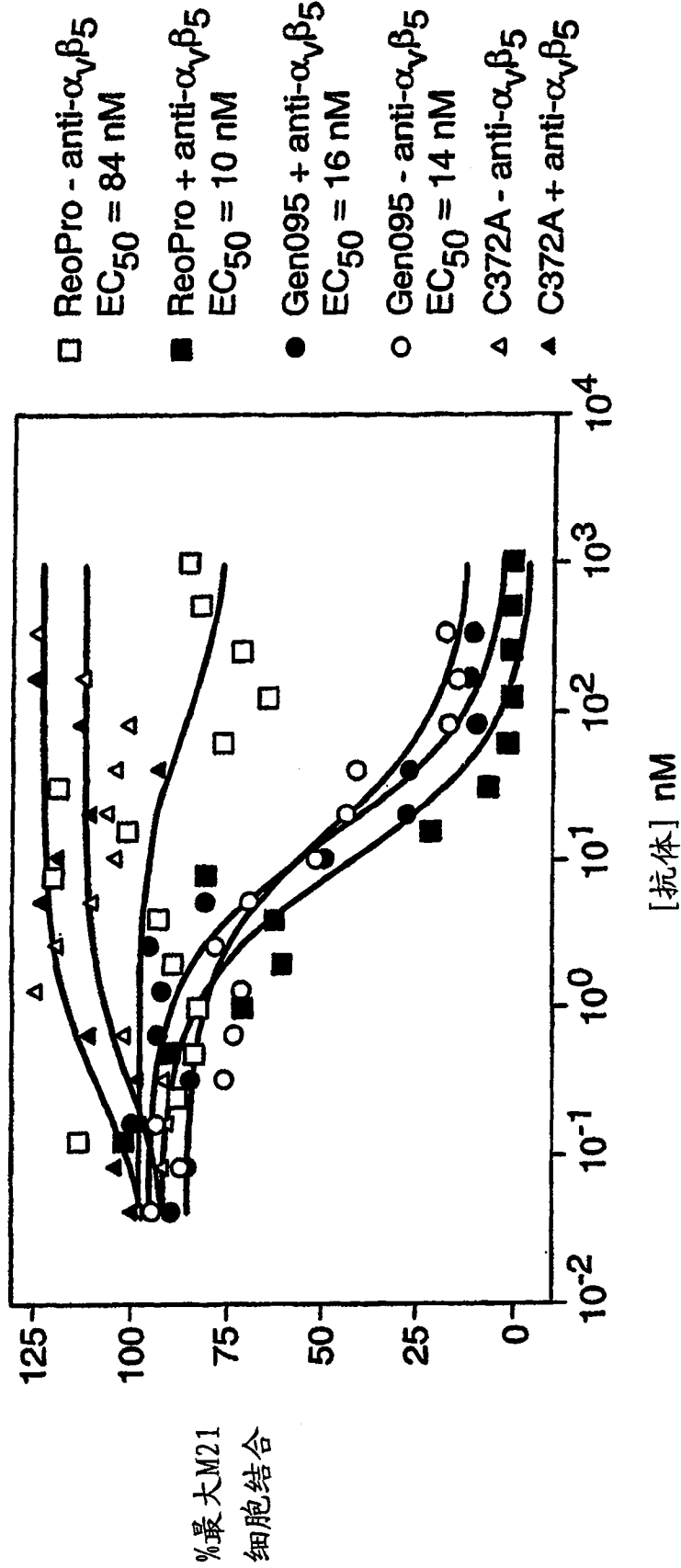


图 2

人乳腺癌MDAMB435L2细胞与玻连蛋白的粘附

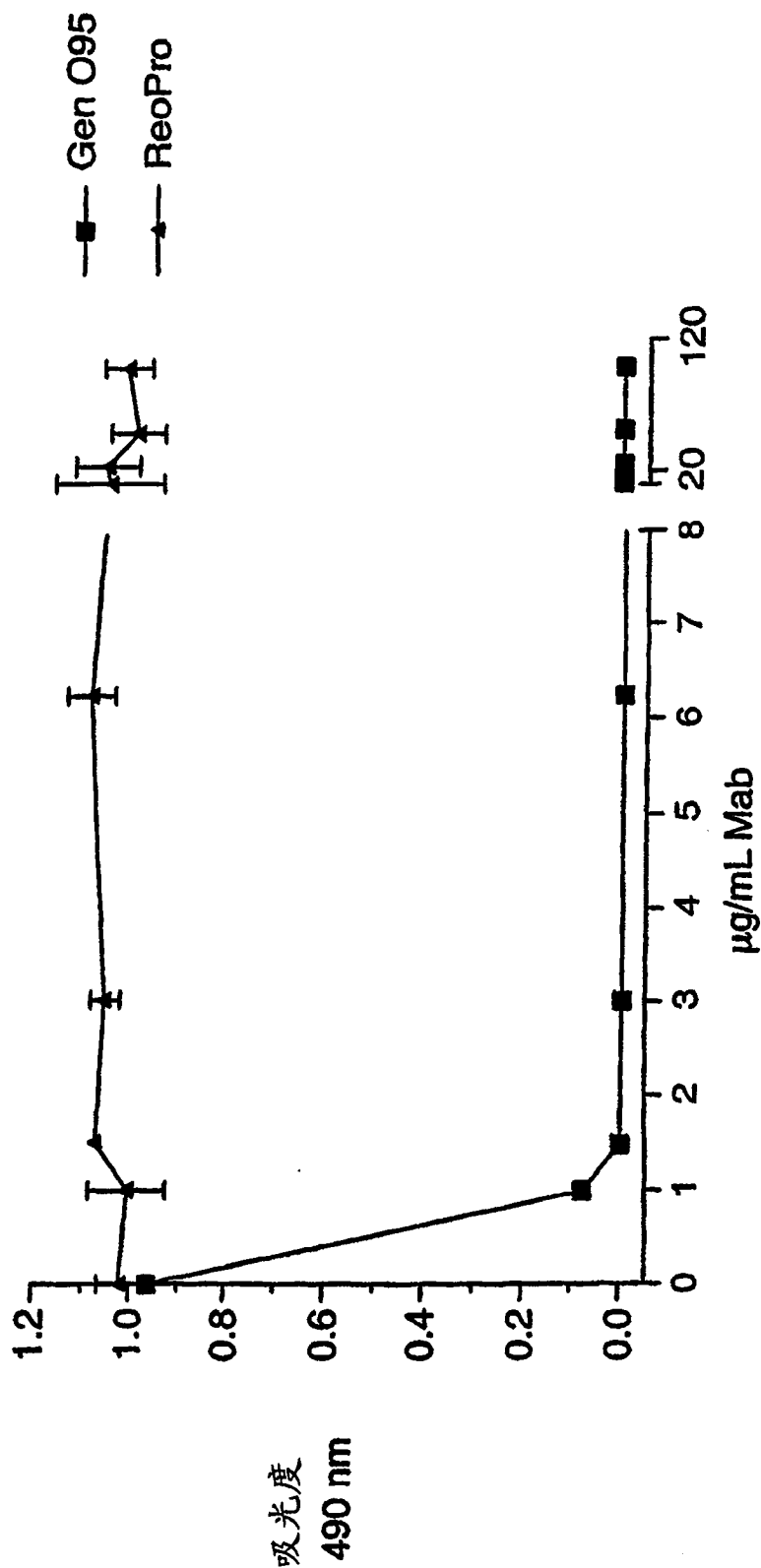


图 3

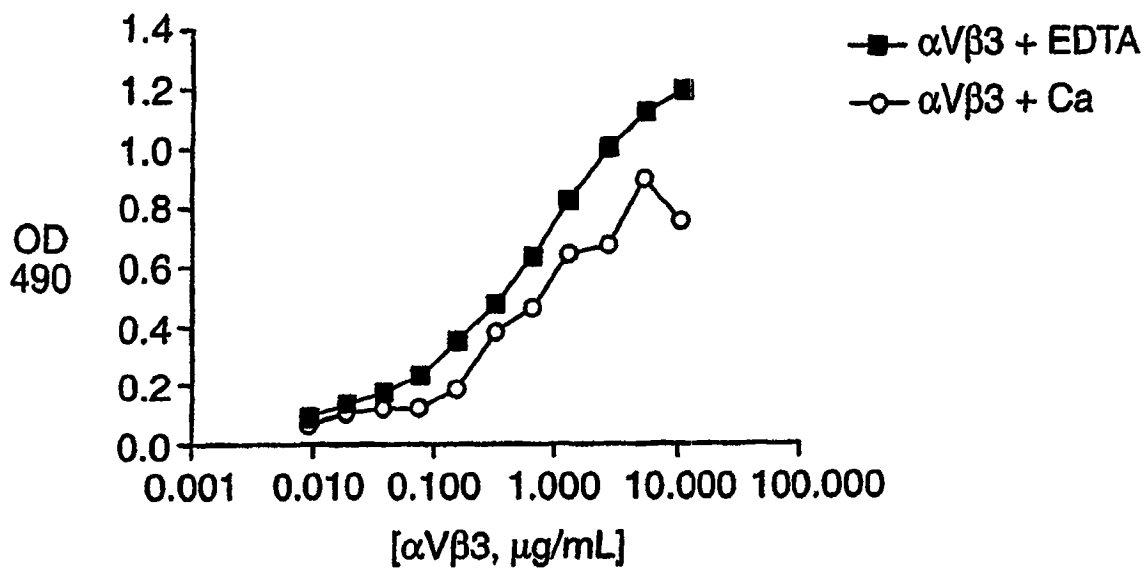
**50 mM EDTA (无  $\text{Ca}^{++}$ ) 存在下或  $\text{Ca}^{++}$** 单独存在下  $\alpha\text{V}\beta 3$  与 **GenO95** 板的结合

图 4A

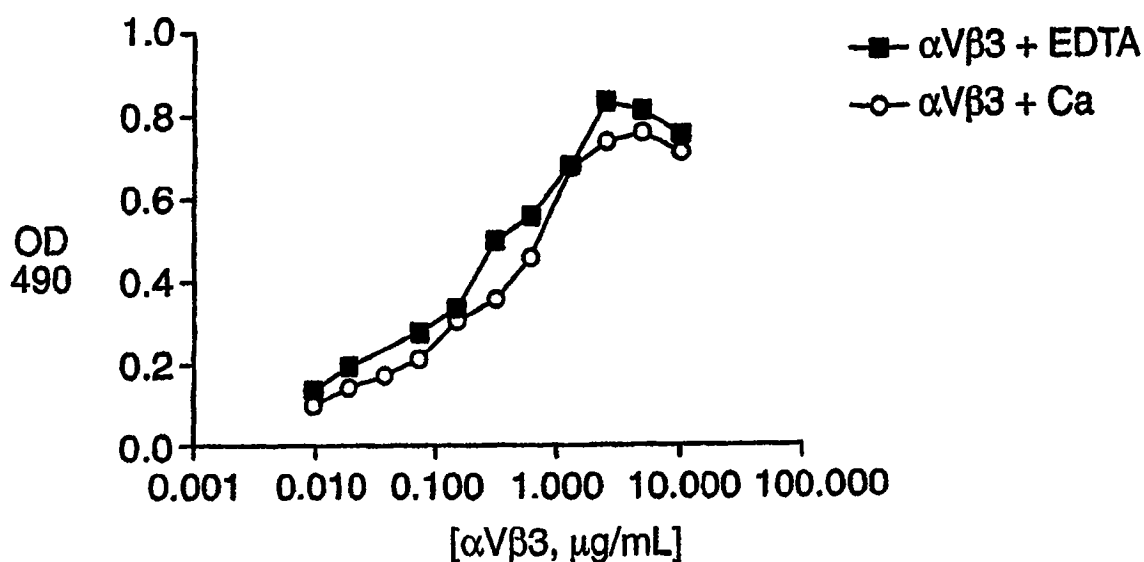
**50 mM EDTA (无  $\text{Ca}^{++}$ ) 存在下或  $\text{Ca}^{++}$** 单独存在下  $\alpha\text{V}\beta 3$  与 **C372A** 板的结合

图 4B

**50 mM EDTA (无 Ca<sup>++</sup>) 存在下或 Ca<sup>++</sup> 单独存在下  $\alpha$ V $\beta$ 3 与 c7E3 IgG 板的结合**

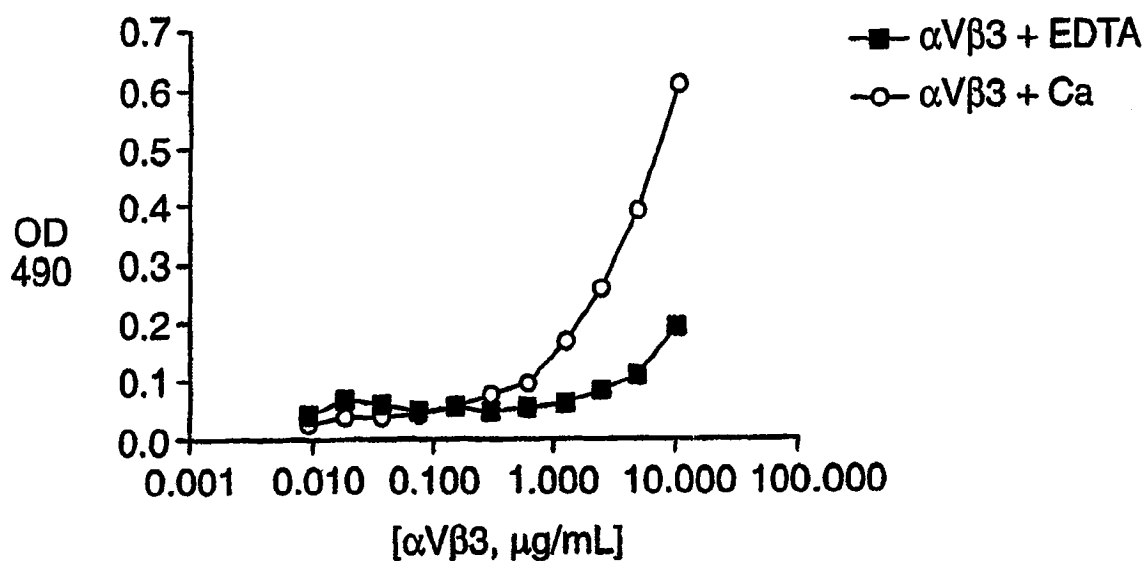


图 4C

**50 mM EDTA (无 Ca<sup>++</sup>) 存在下或 Ca<sup>++</sup> 单独存在下  $\alpha$ V $\beta$ 3 与 LM609 IgG 板的结合**

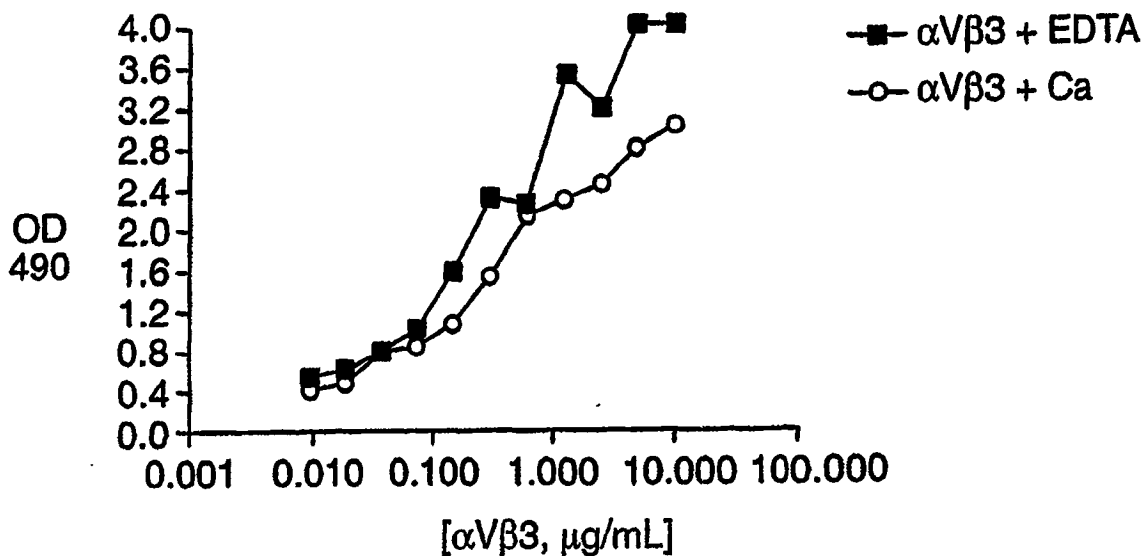


图 4D

**50 mM EDTA (无 Ca<sup>++</sup>) 存在下或 Ca<sup>++</sup> 单独存在下 αVβ5 与 GenO95 IgG 板的结合**

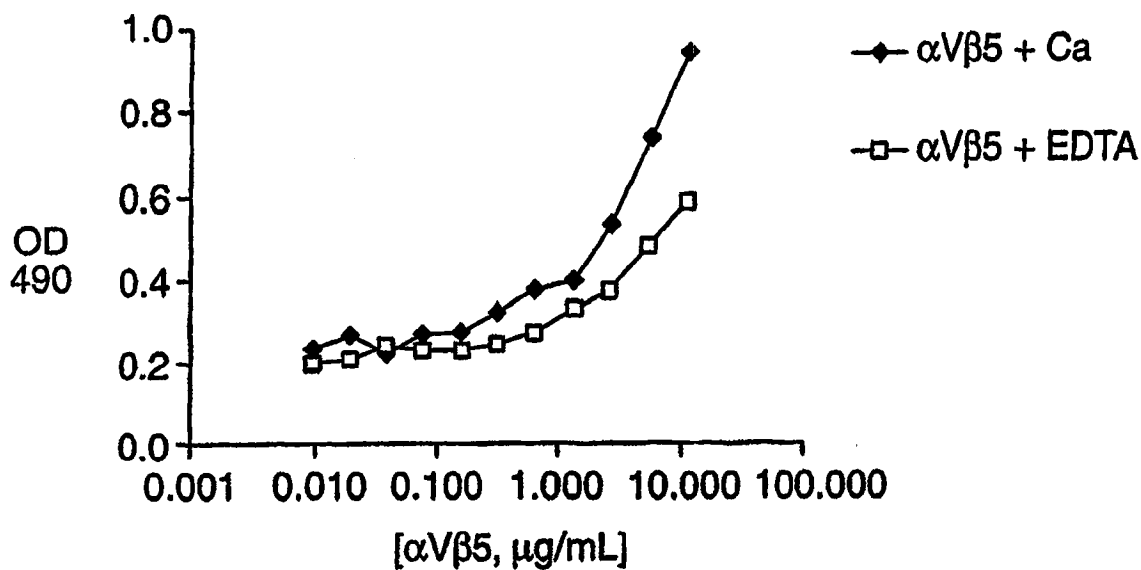


图 4E

**50 mM EDTA (无 Ca<sup>++</sup>) 存在下或 Ca<sup>++</sup> 单独存在下 αVβ5 与 C372 IgG 板的结合**

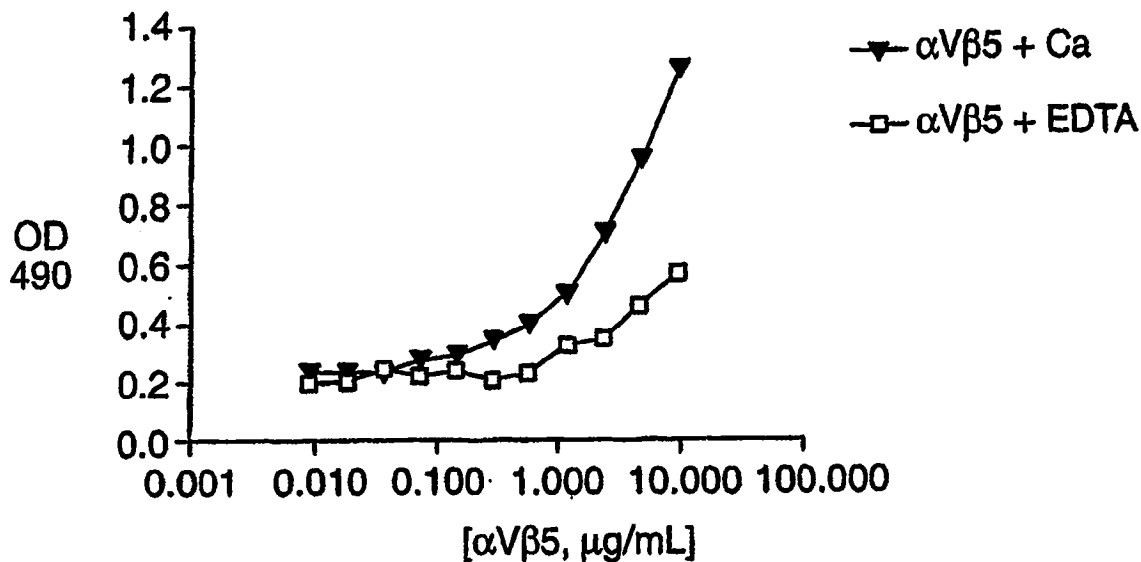


图 4F

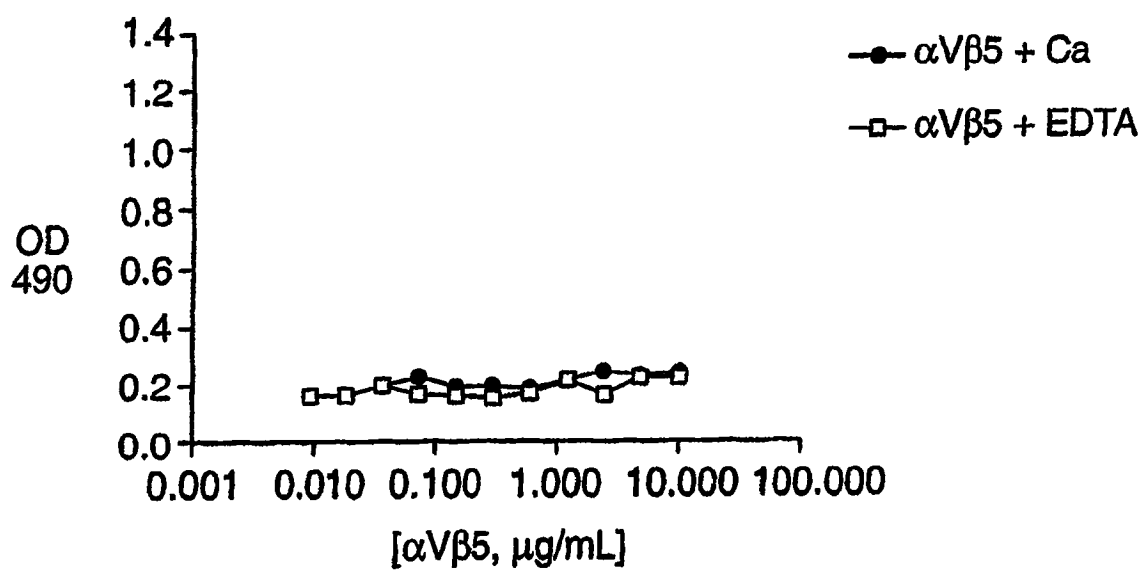
**50 mM EDTA (无  $\text{Ca}^{++}$ ) 存在下或  $\text{Ca}^{++}$** 单独存在下  $\alpha\text{V}\beta 5$  与 c7E3 IgG 板的结合

图 4G

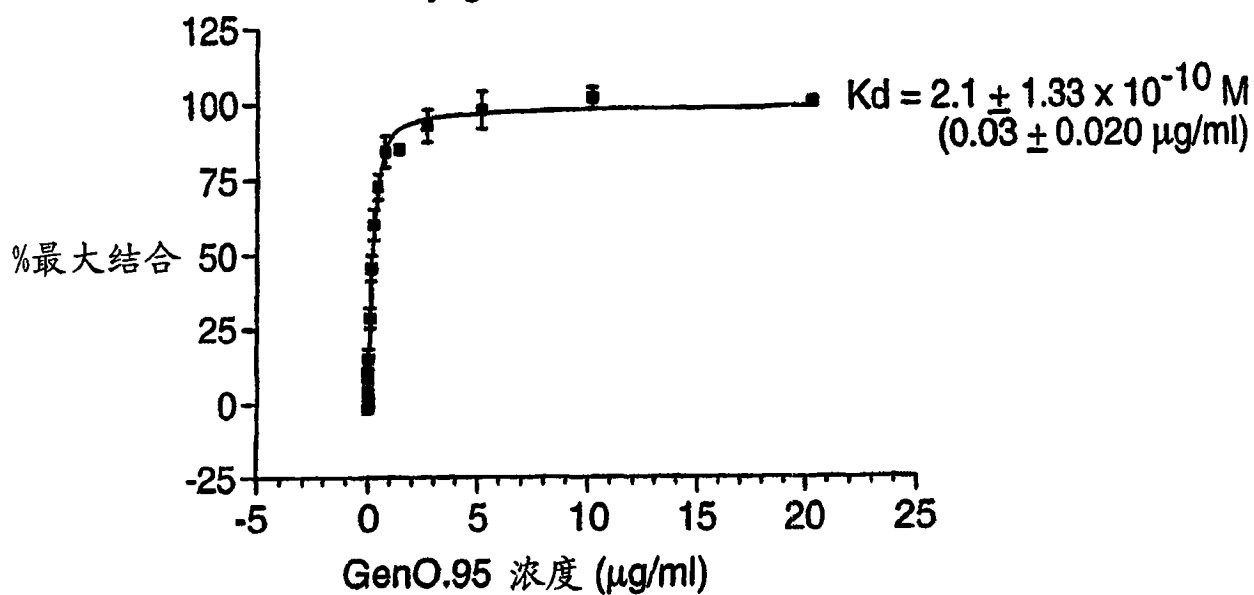
 **$\alpha\text{V}\beta 3$  上的 GenO.95 结合 (n=6)**

图 5A



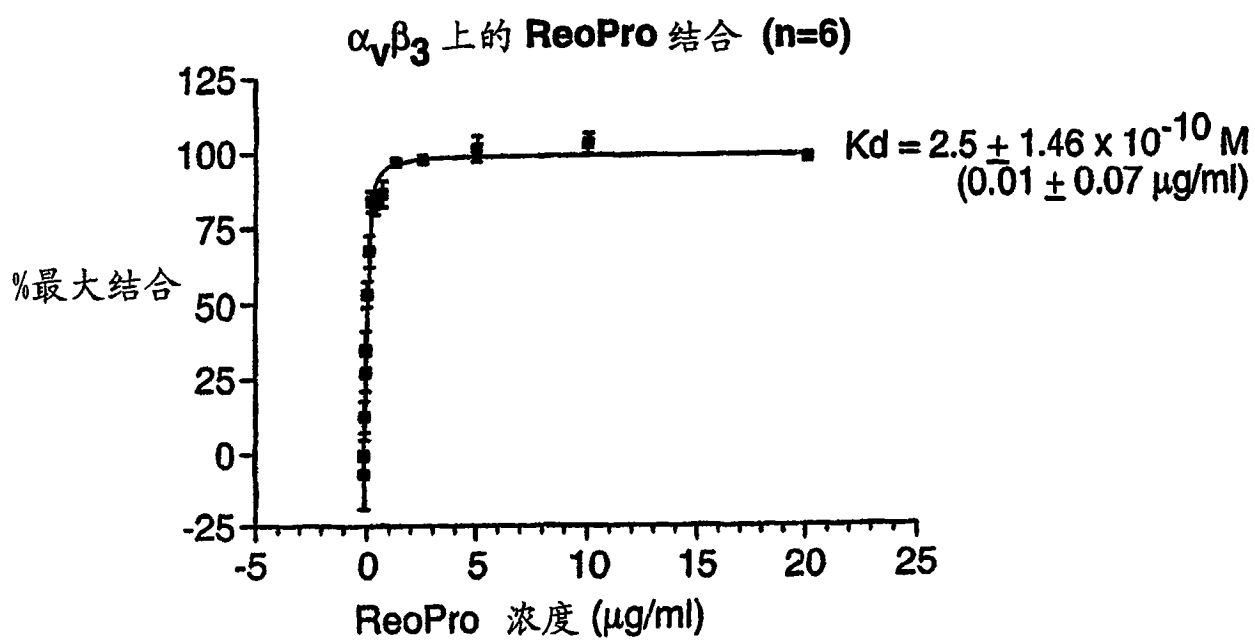


图 5B

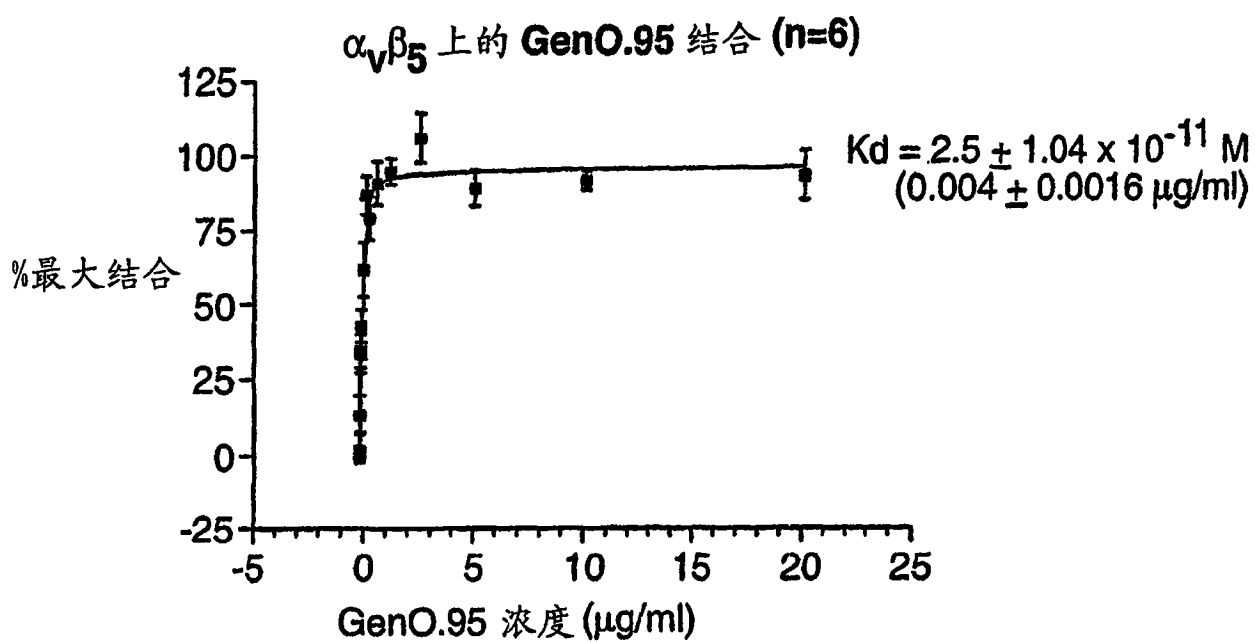


图 6A

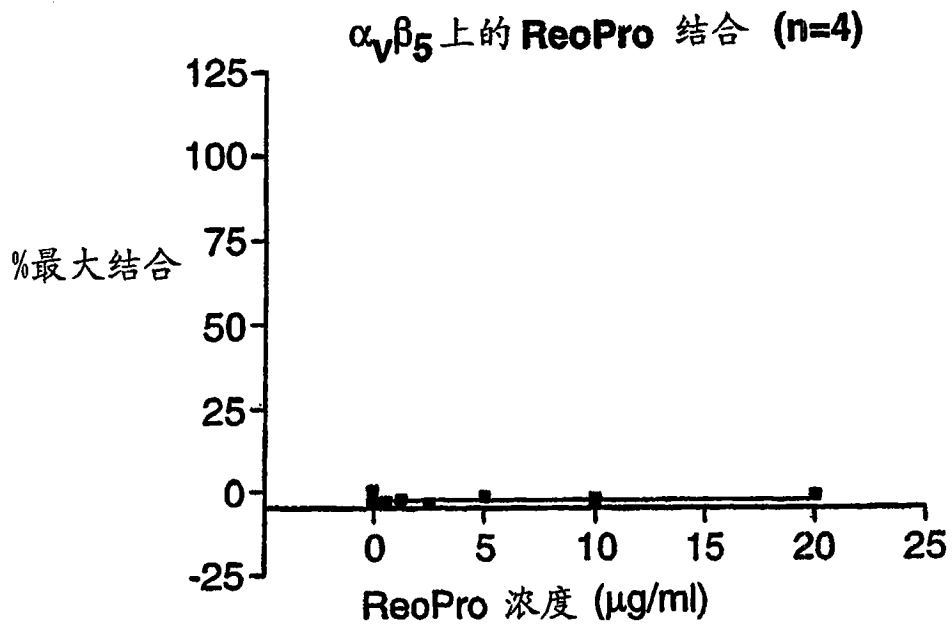


图 6B

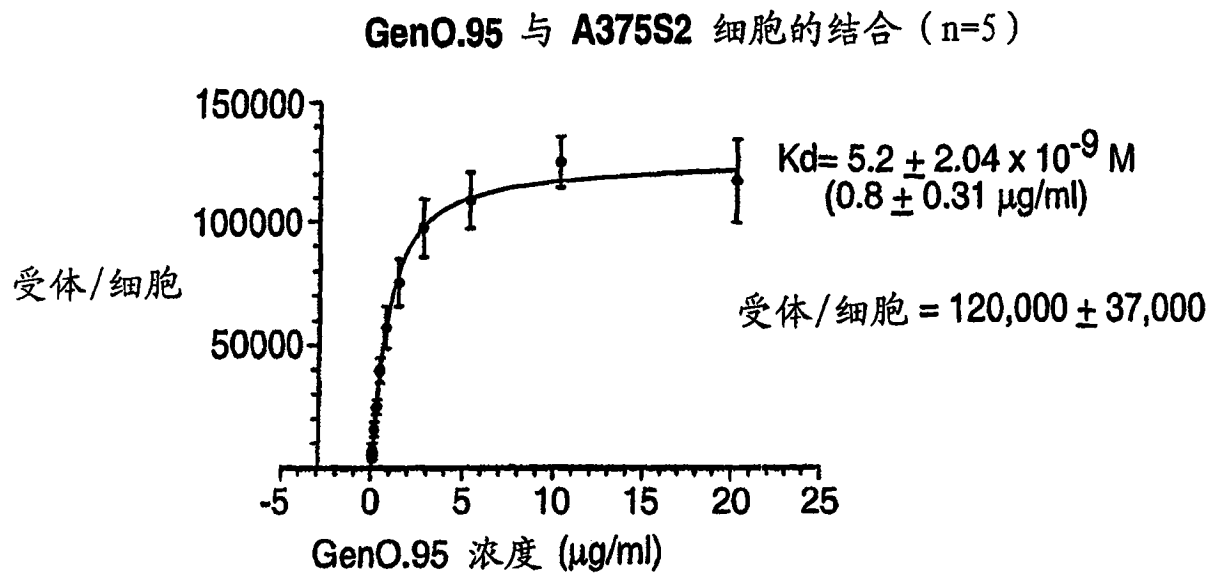


图 7A

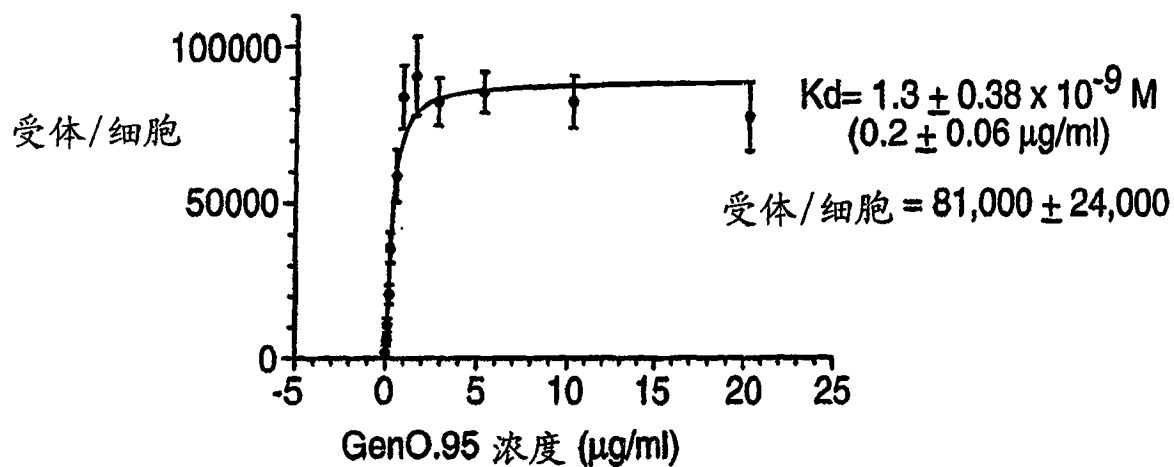
**GenO.95 与 HT-29 细胞的结合 (n=5)**

图 7B

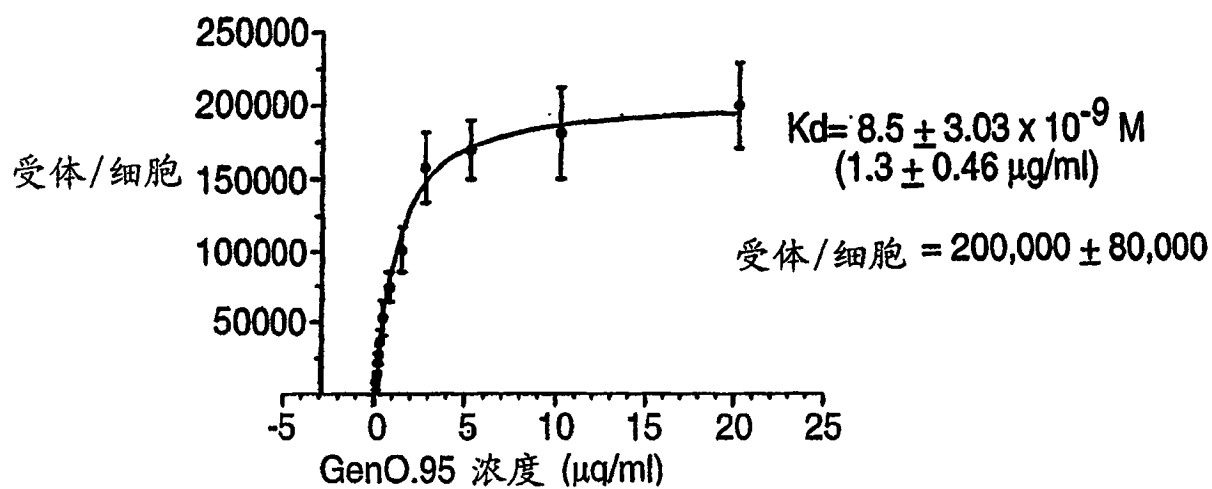
**GenO.95 与 M21 细胞的结合 (n=5)**

图 7C

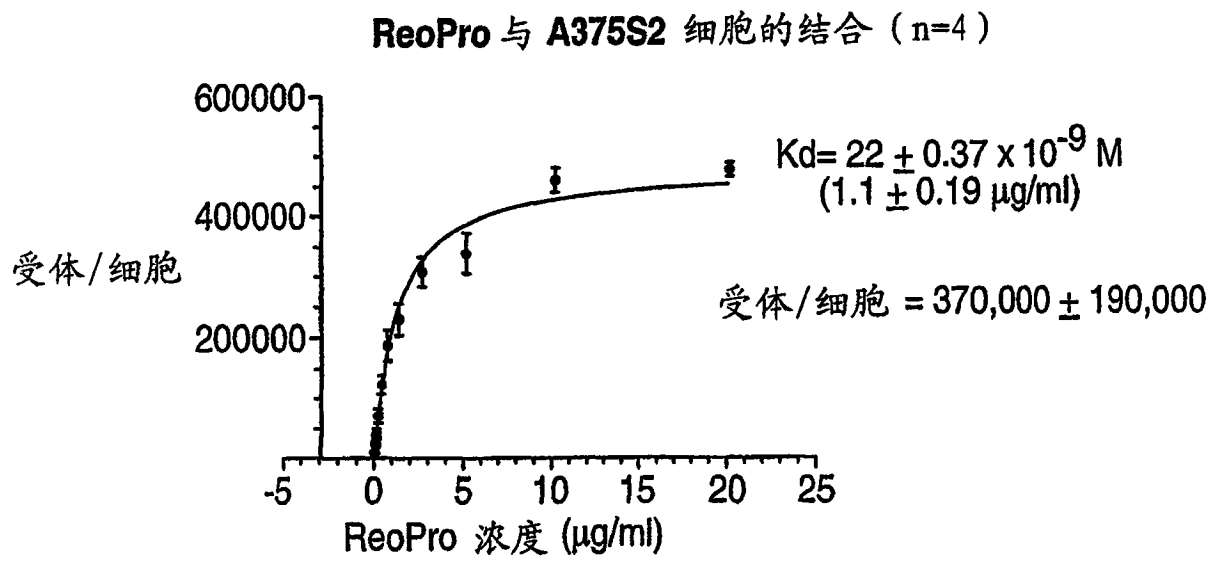


图 8A

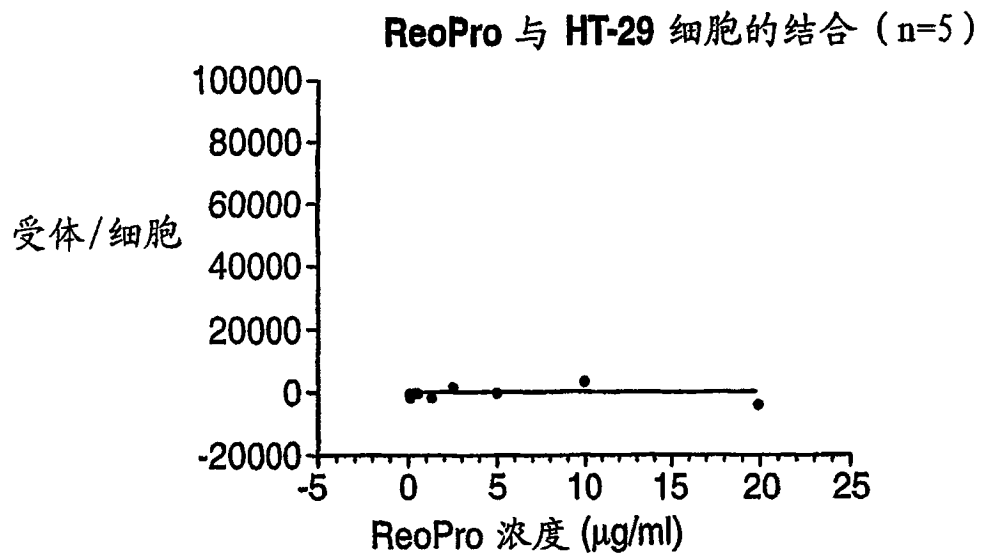


图 8B

ReoPro 与 M21 细胞的结合 (n=4)

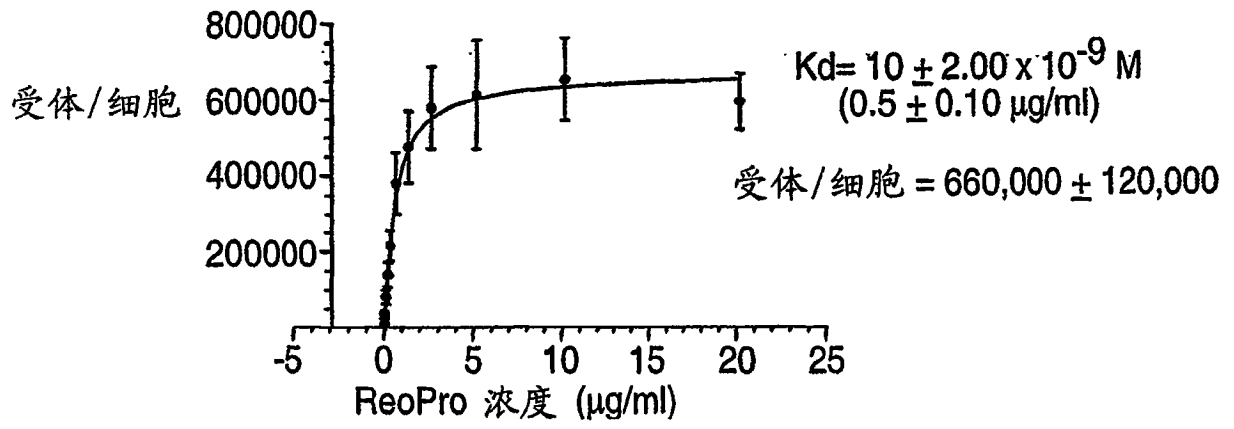


图 8C

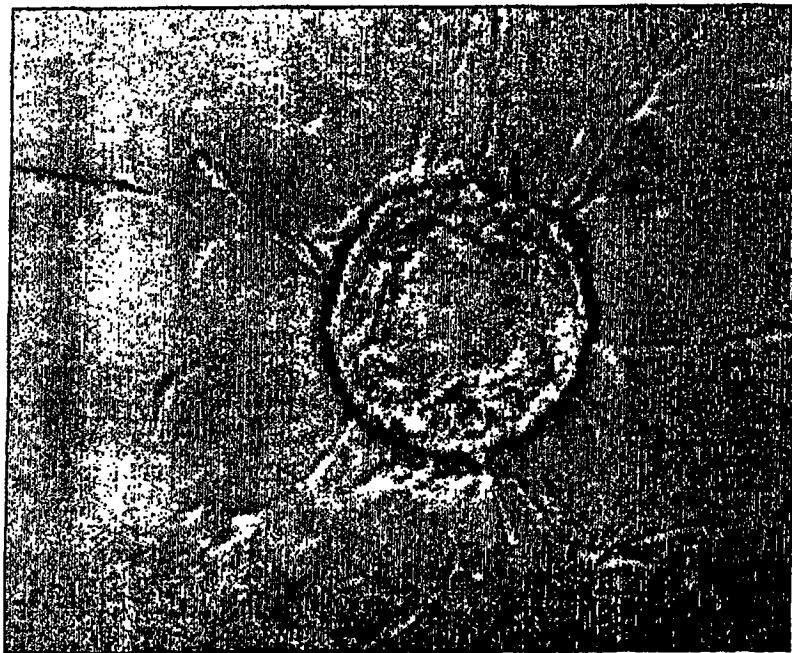


图 9

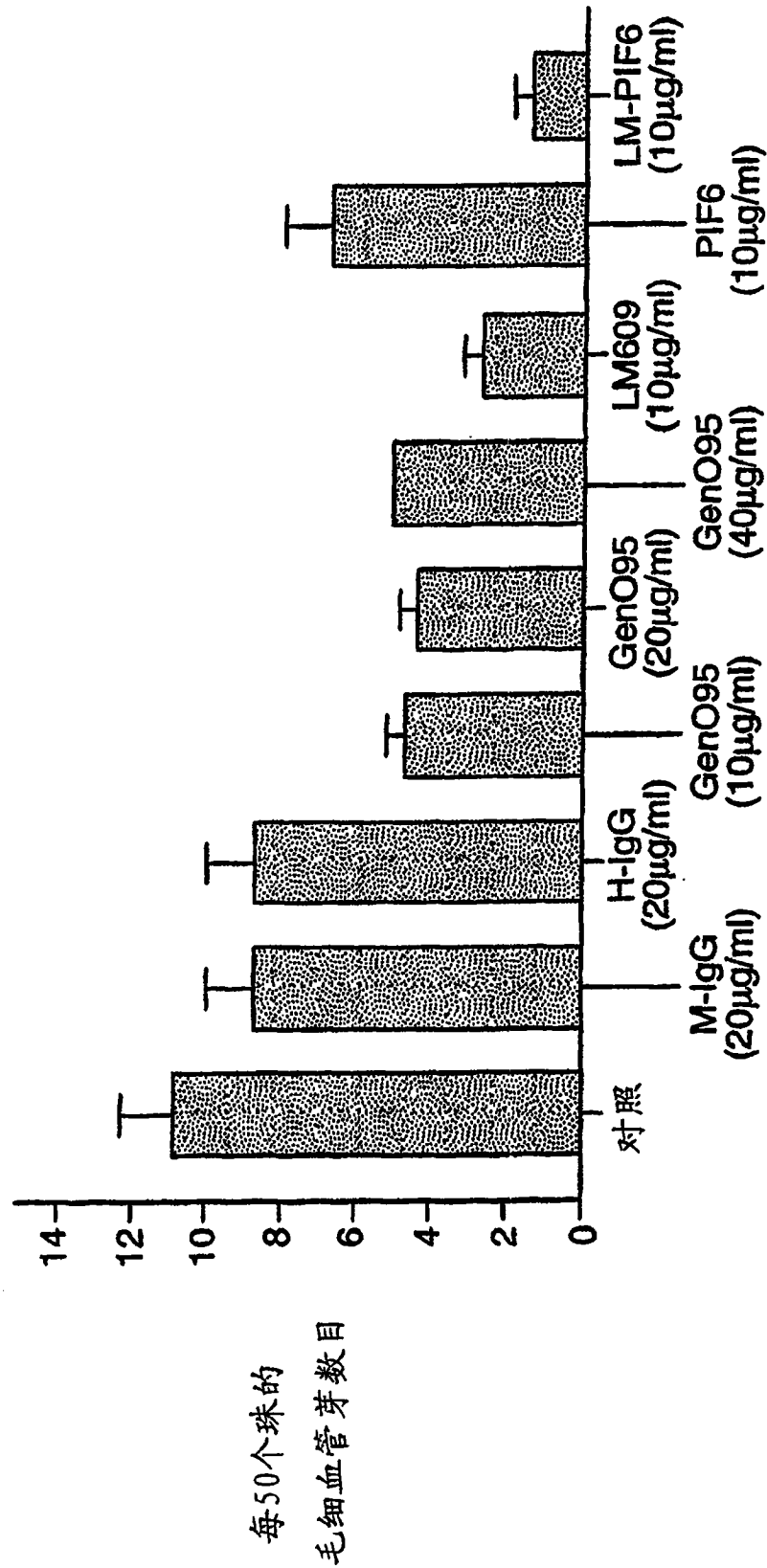


图 10

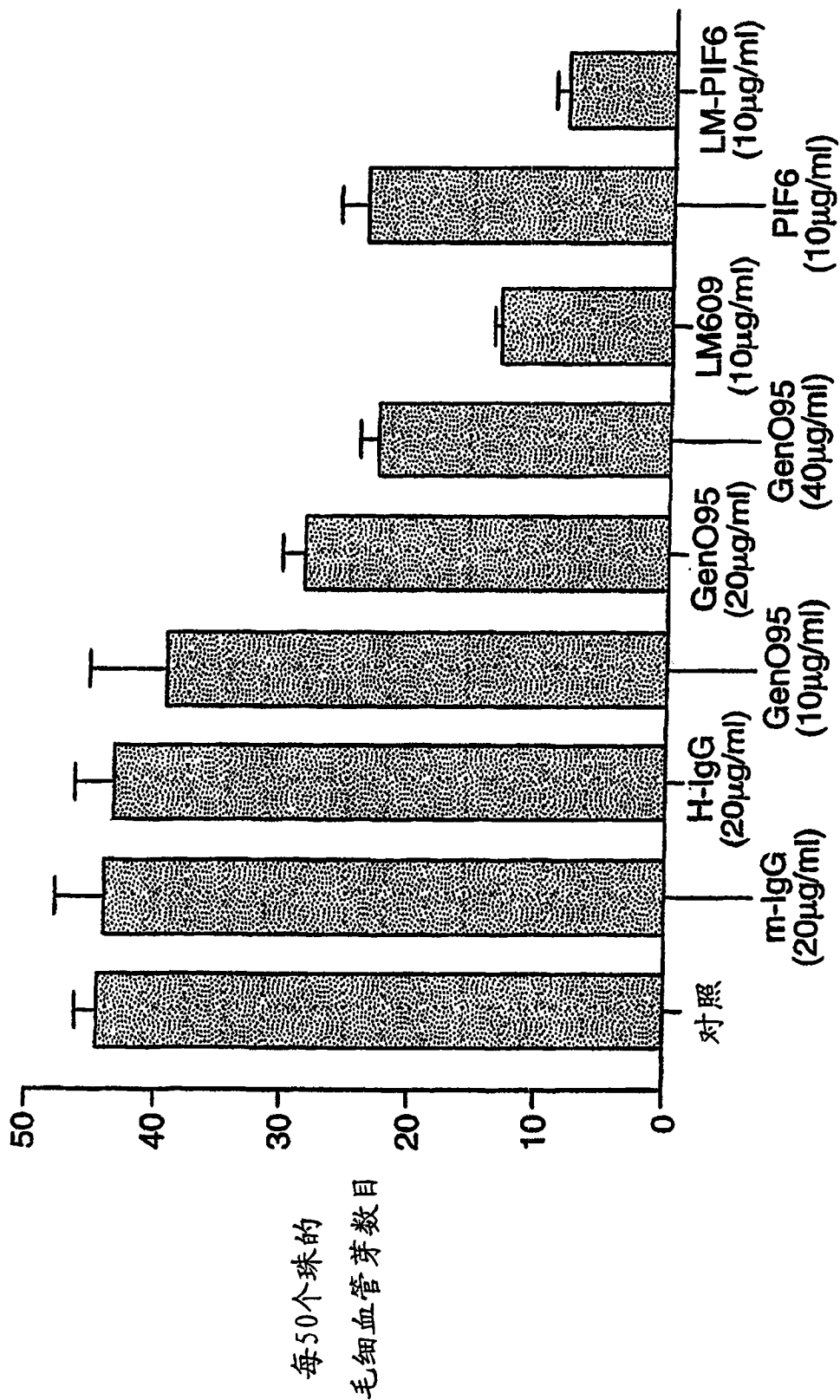


图 11

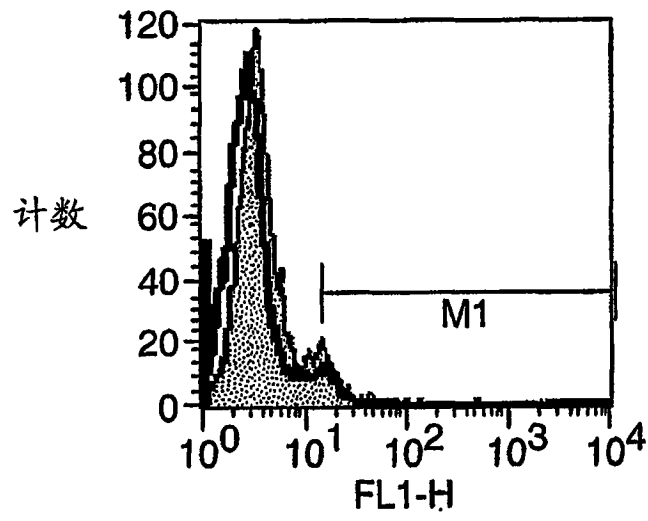


图 12A

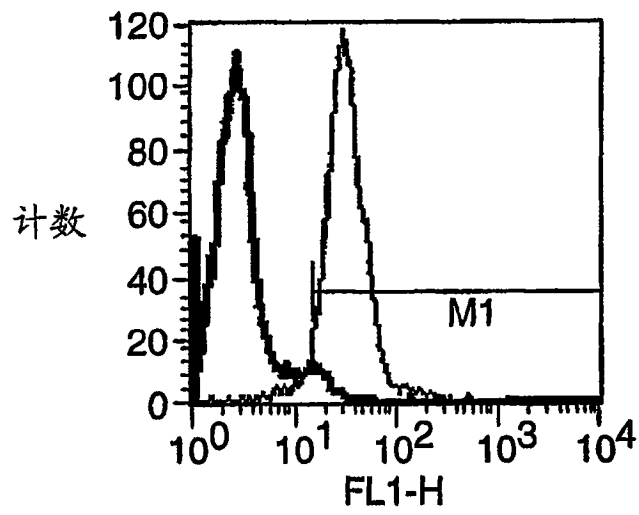


图 12B



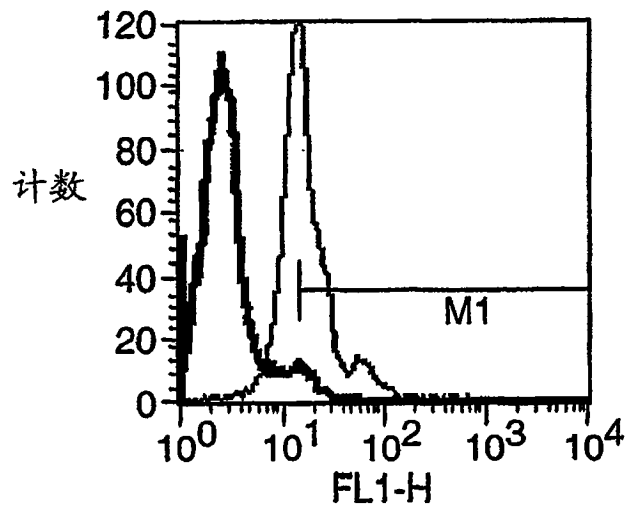


图 12C

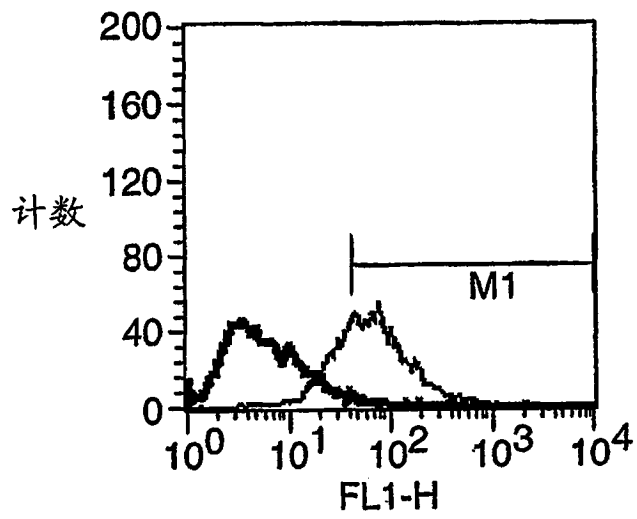


图 12D

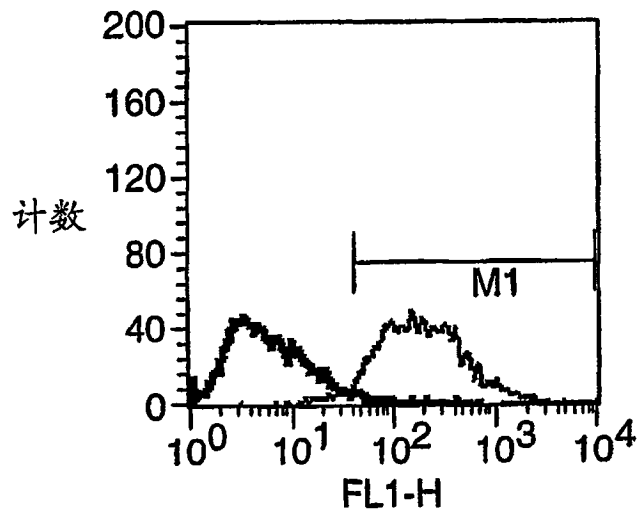


图 12E

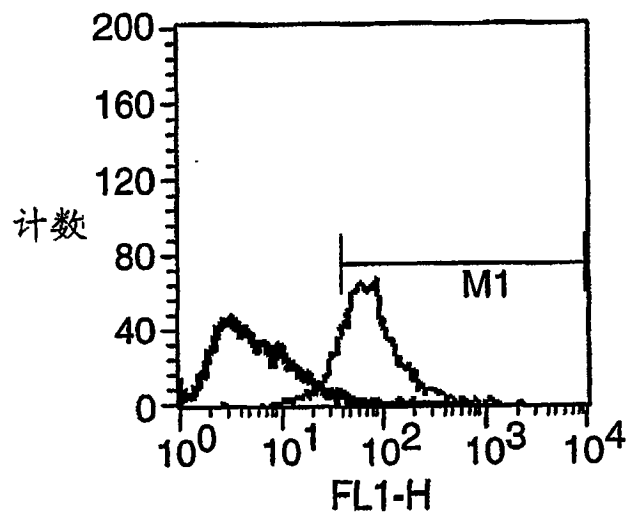


图 12F

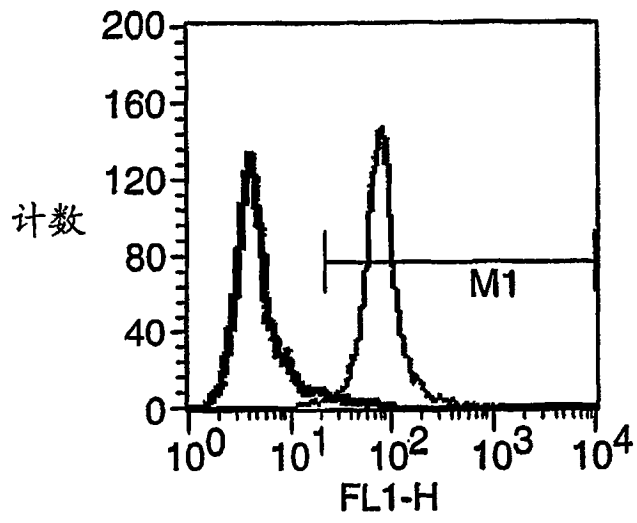


图 12G

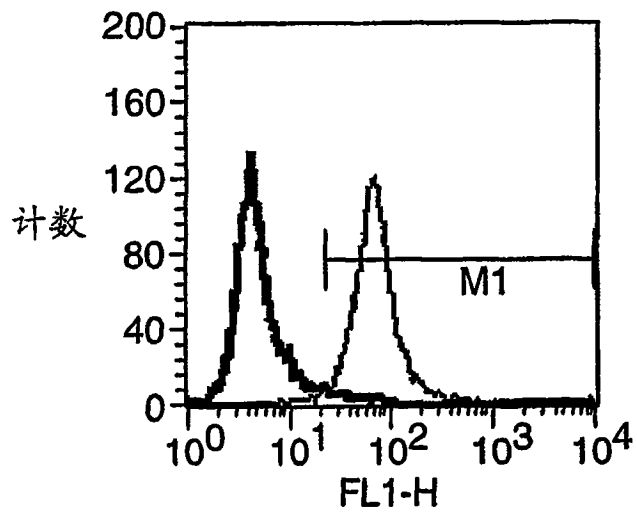


图 12H

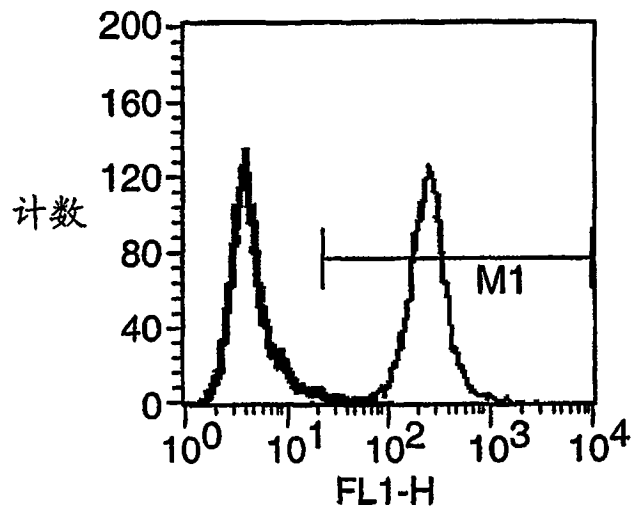


图 12I

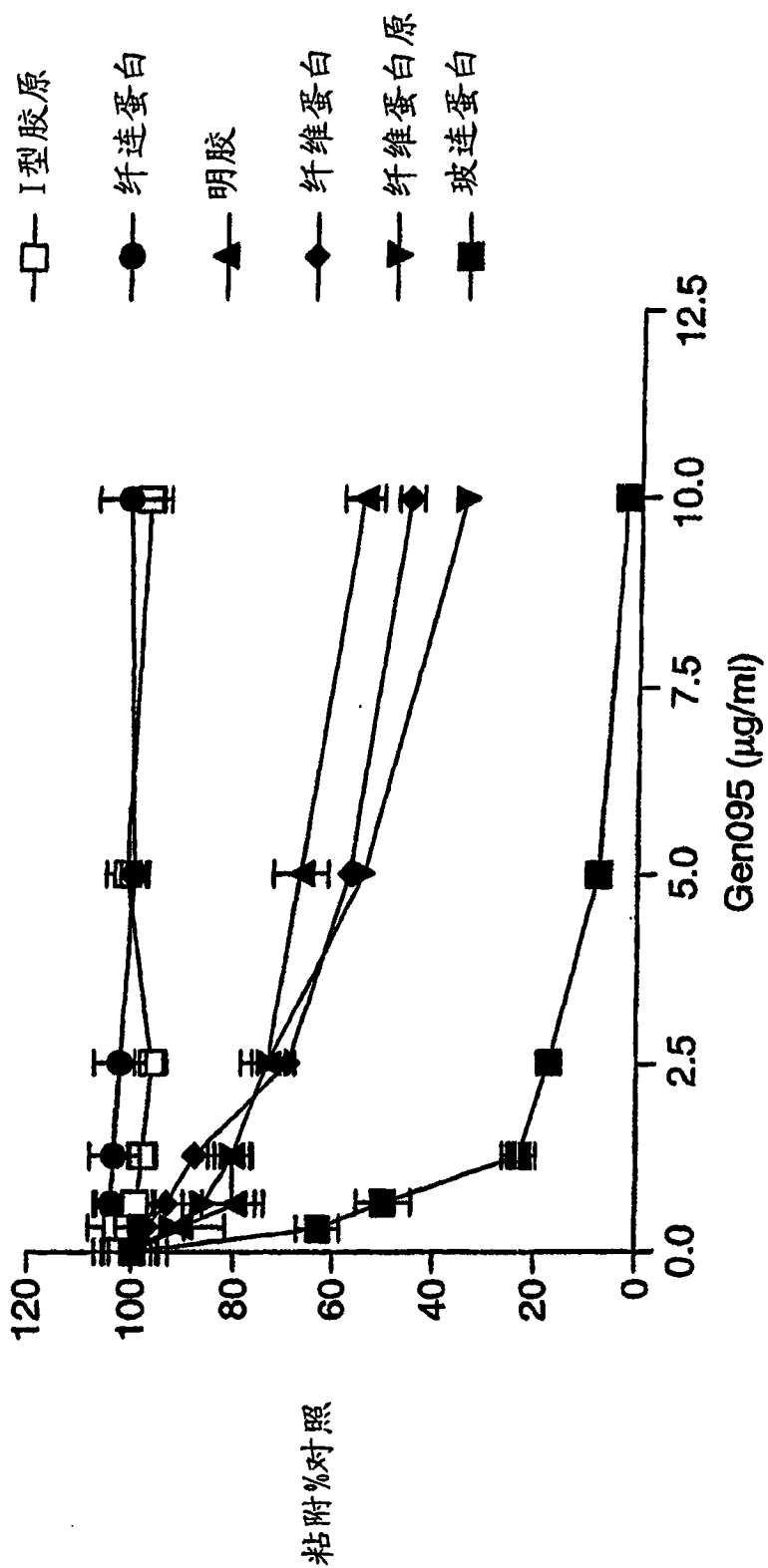


图 13

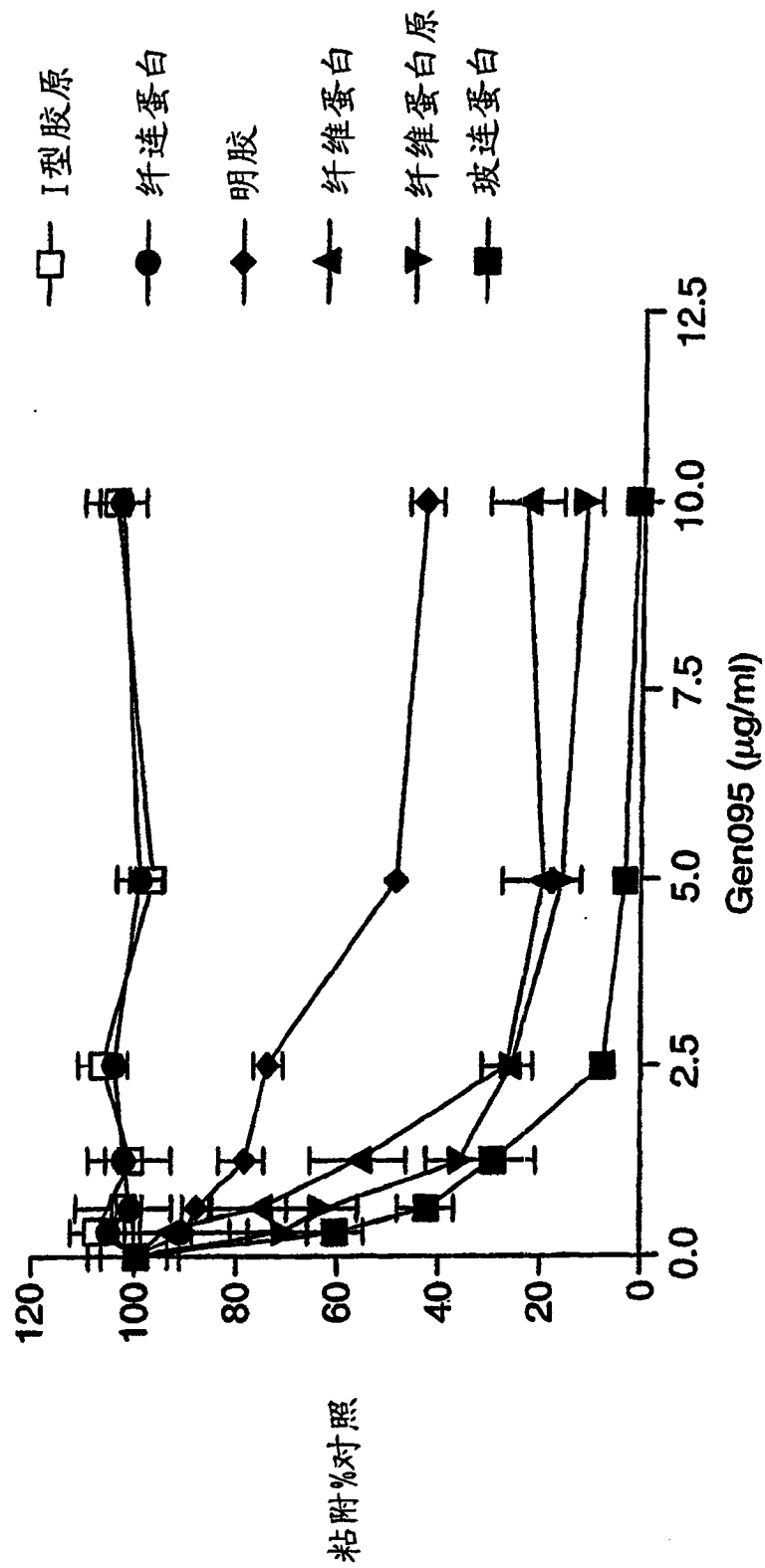


图 14

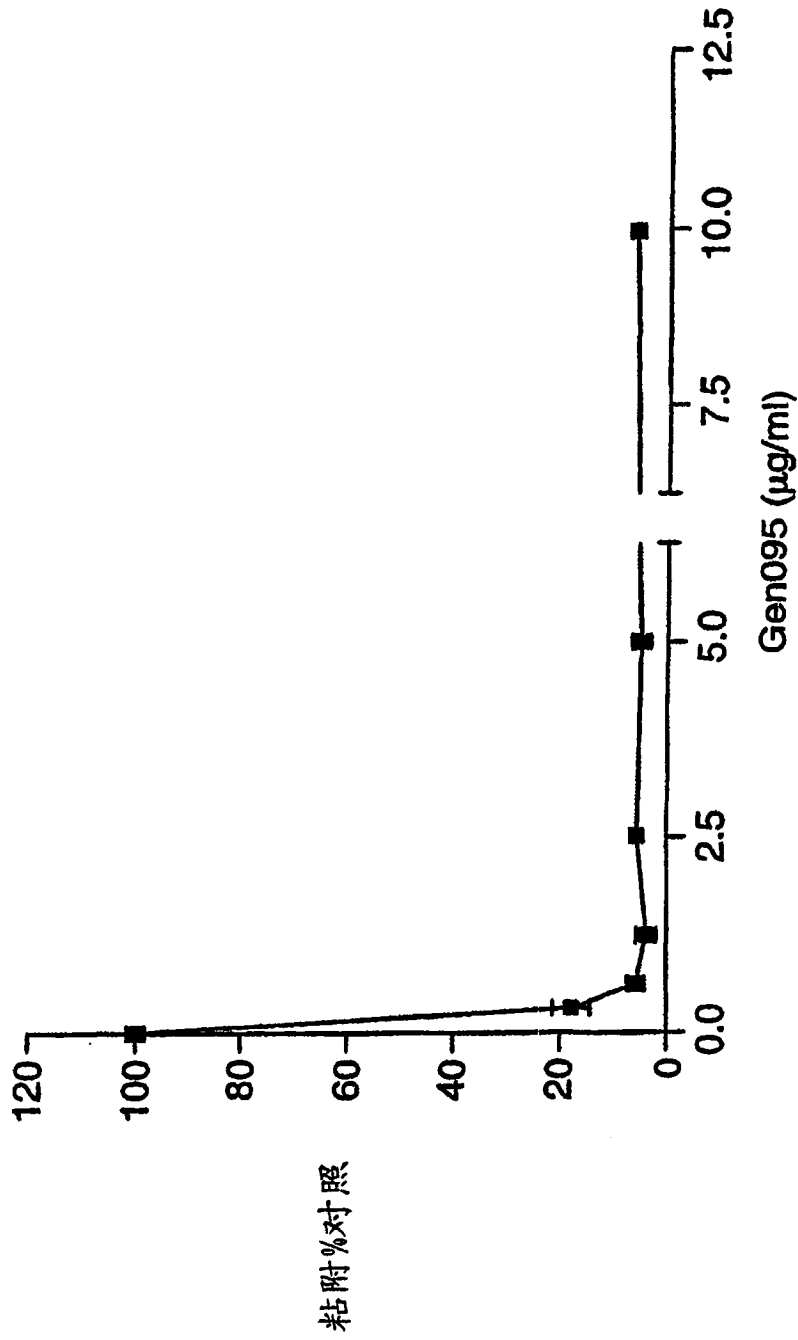


图 15



图 16A

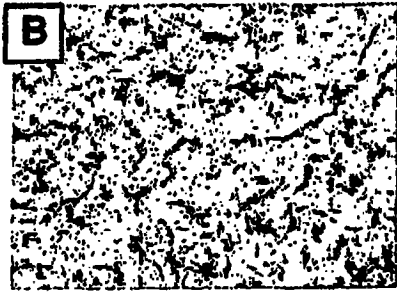


图 16B

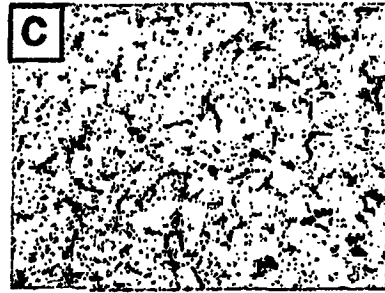


图 16C

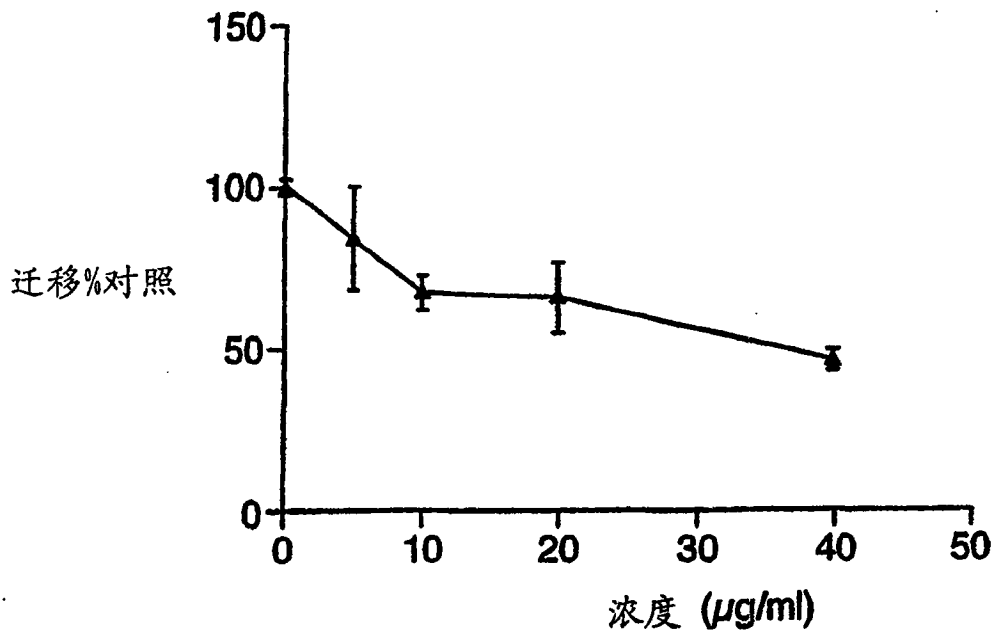


图 16D



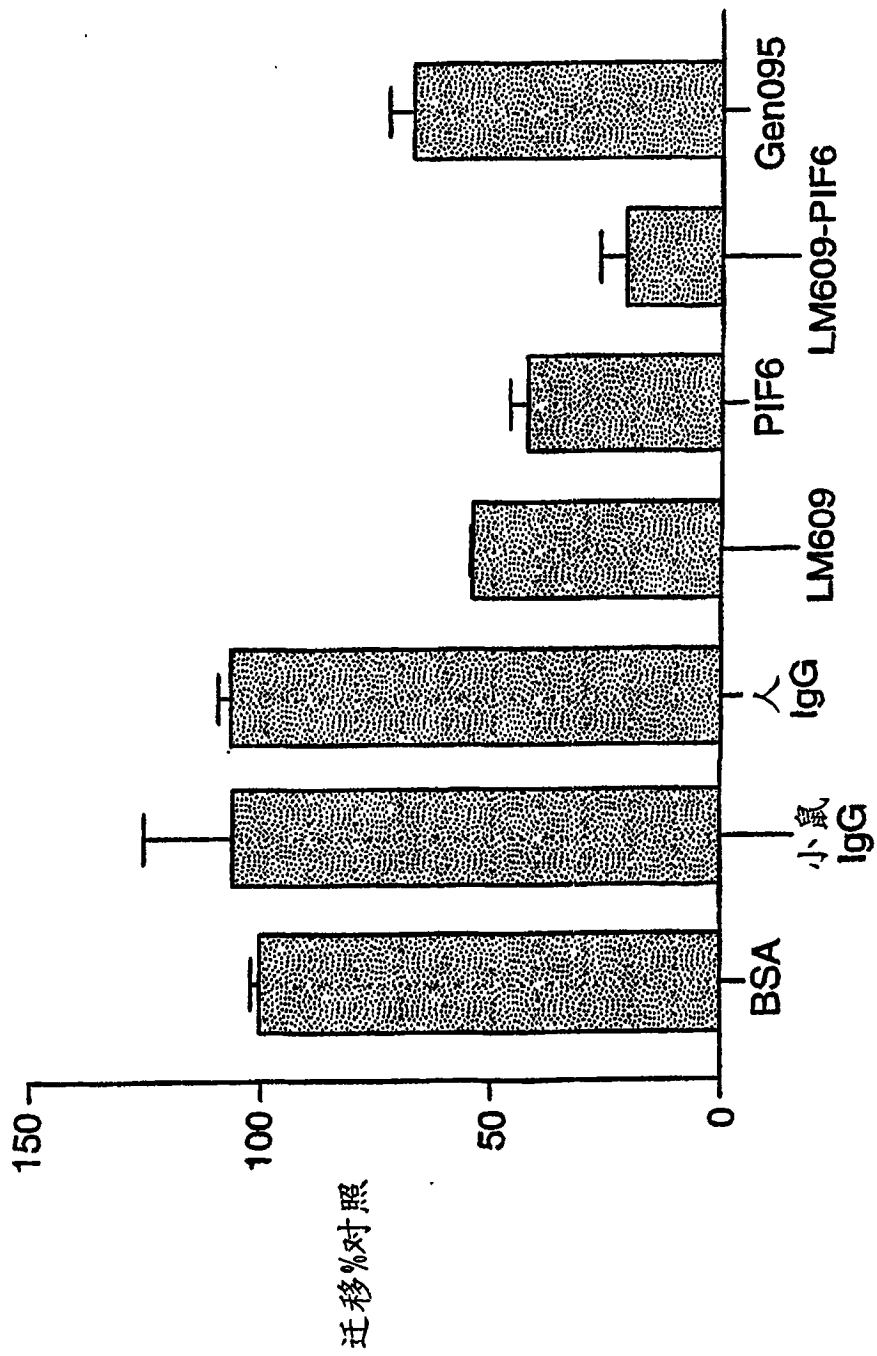


图 17

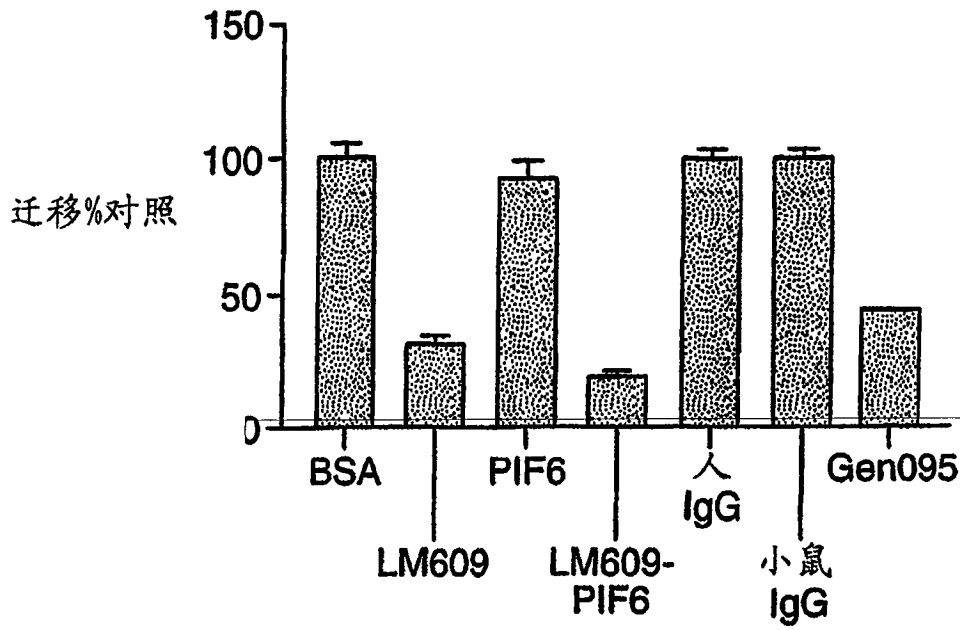


图 18A

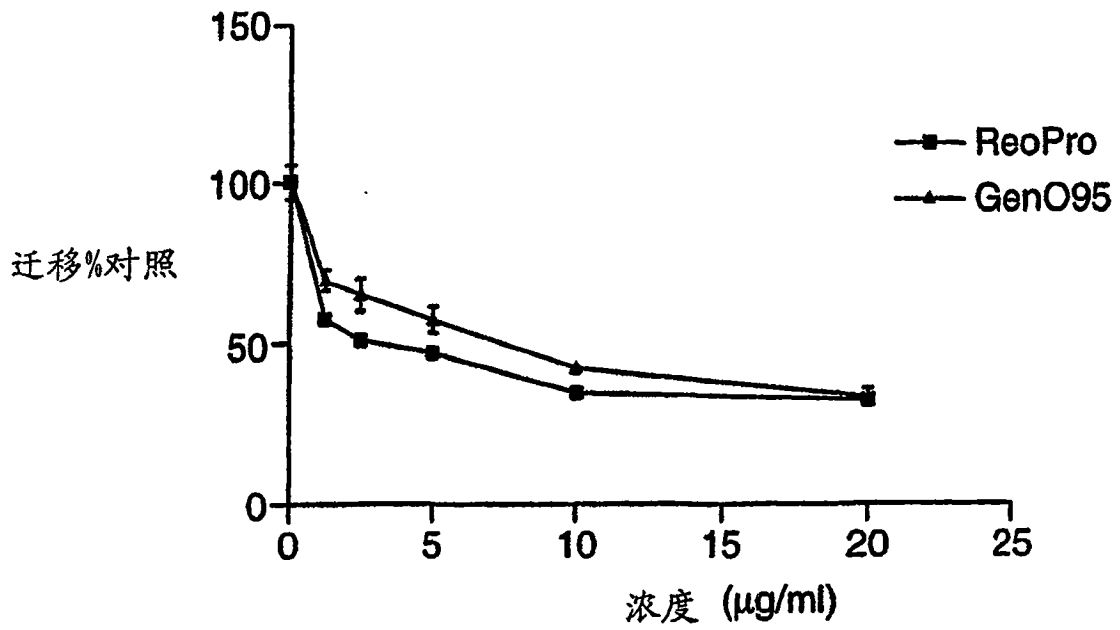


图 18B

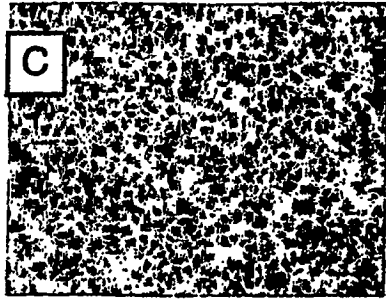


图 18C

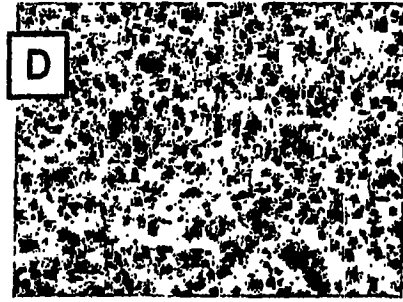


图 18D

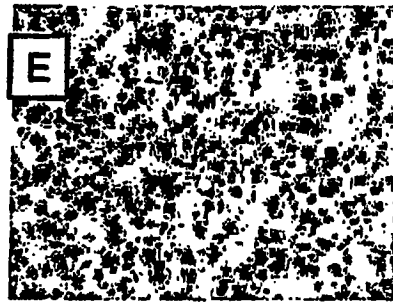


图 18E

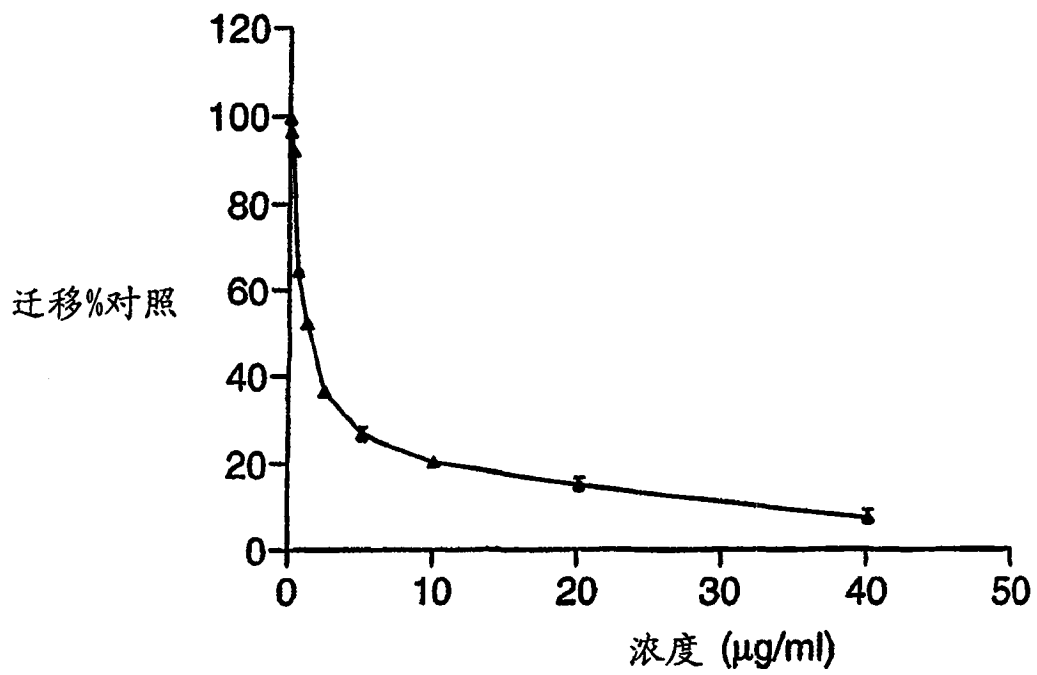


图 19A

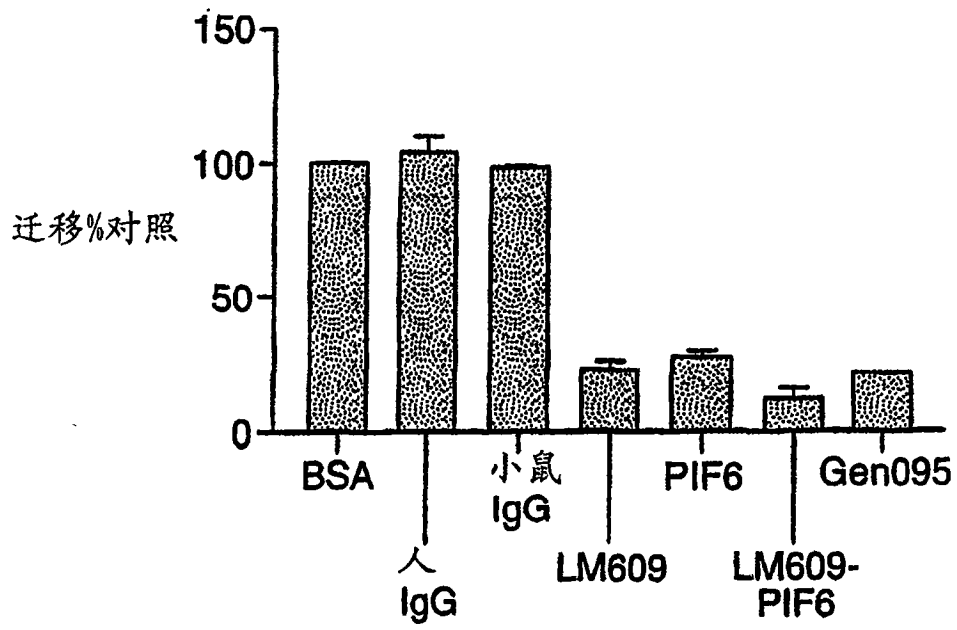


图 19B

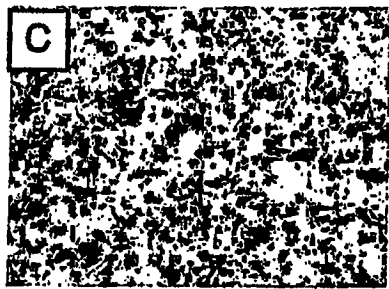


图 19C

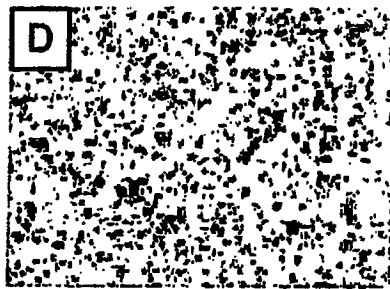


图 19D

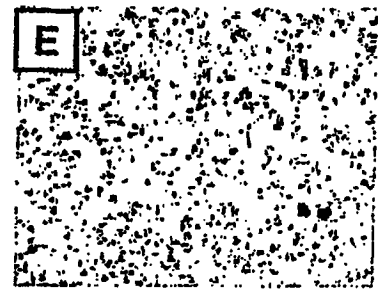


图 19E

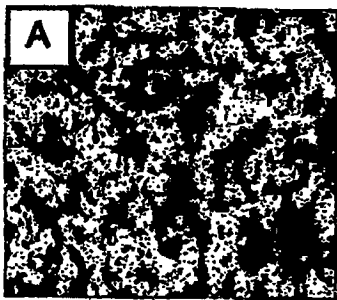


图 20A

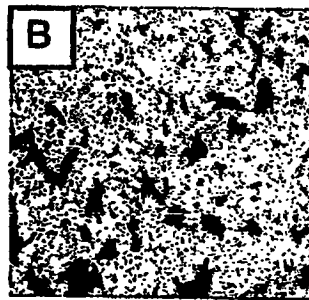


图 20B

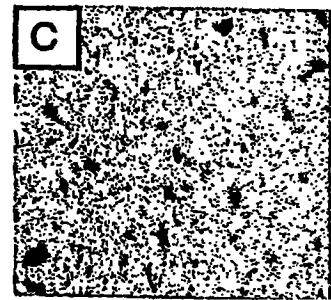


图 20C



图 20D

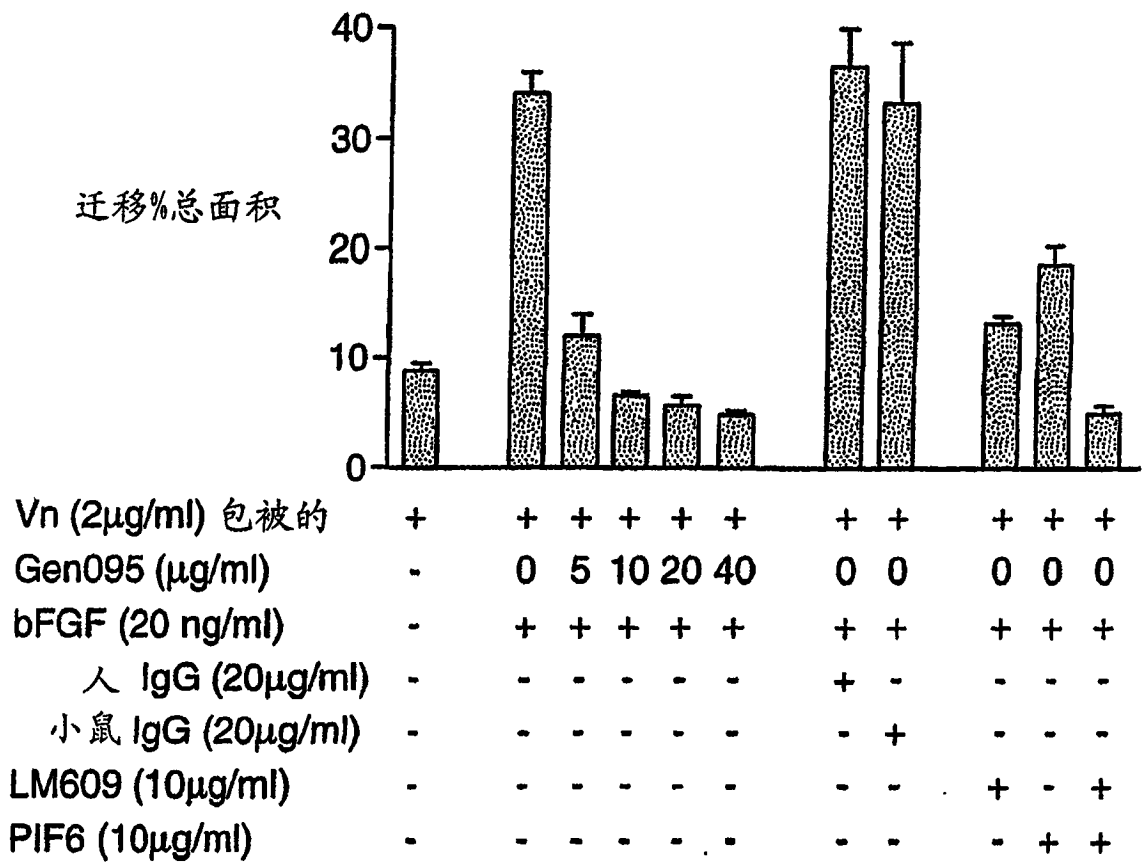


图 20E

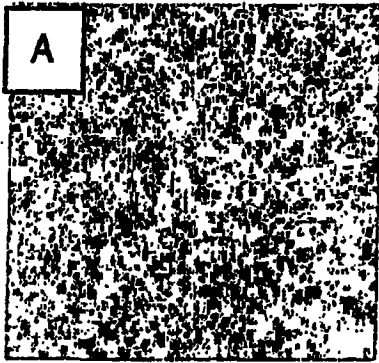


图 21A

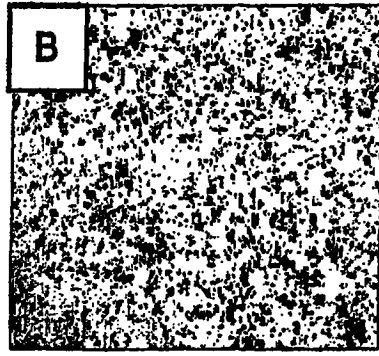


图 21B

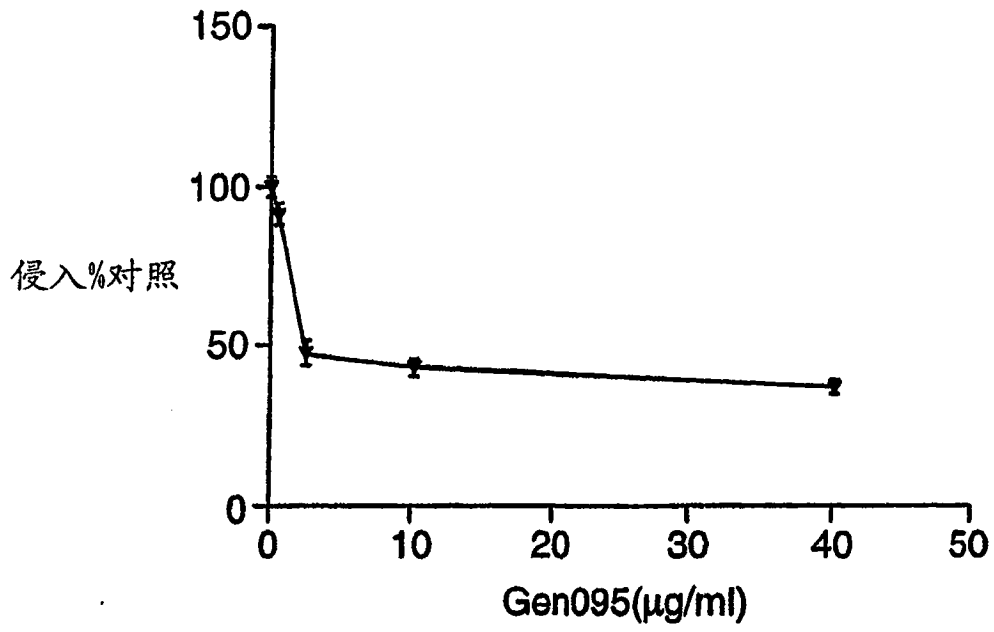


图 21C

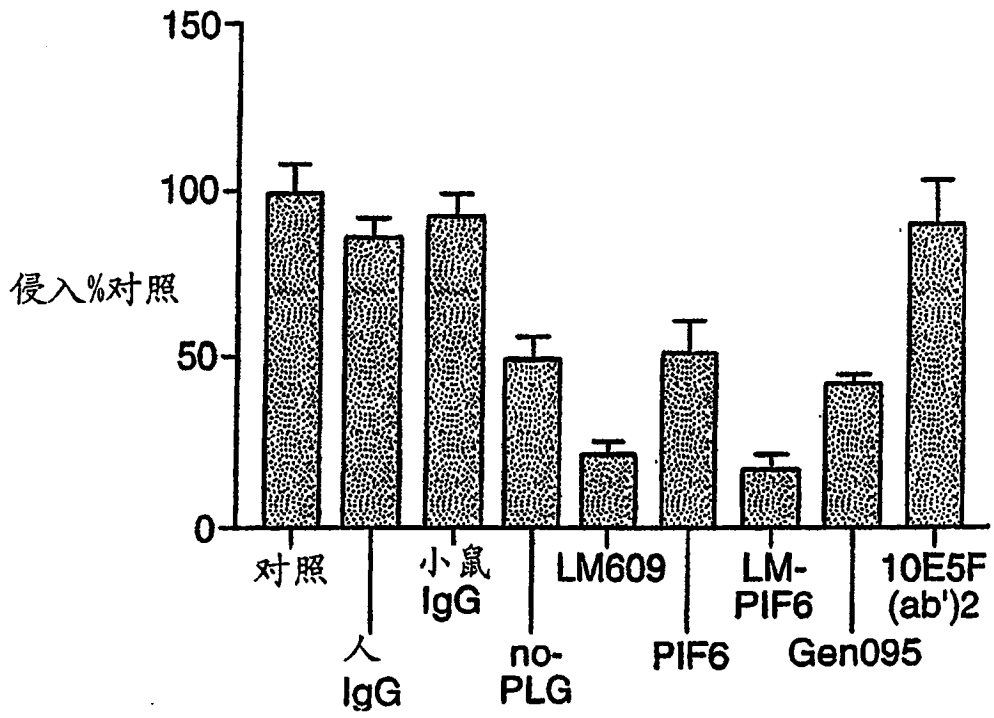


图 21D