



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I504409 B

(45) 公告日：中華民國 104 (2015) 年 10 月 21 日

(21) 申請案號：099108558 (22) 申請日：中華民國 99 (2010) 年 03 月 23 日

(51) Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)* *C12N15/13 (2006.01)*  
*C07K16/18 (2006.01)* *A61P27/02 (2006.01)*  
*A61P37/00 (2006.01)* *A61P35/00 (2006.01)*

(30) 優先權：2009/03/25 美國 61/163,241

(71) 申請人：建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)  
 美國

(72) 發明人：梁偉慶 LIANG, WEI CHING (TW)；波羅曼 葛格瑞 D PLOWMAN, GREGORY D.  
 (US)；吳彥 WU, YAN (US)；葉蔚藍 YE, WEILAN (US)

(74) 代理人：陳長文

(56) 參考文獻：

TW 200813090	WO 2004/056308A2
WO 2005/092073A2	WO 2007/134876A2

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：43 項 圖式數：13 共 163 頁

(54) 名稱

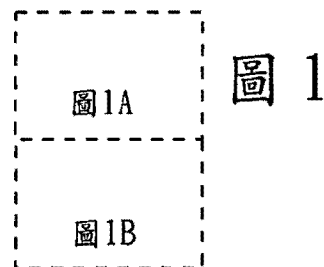
新穎抗- $\alpha 5 \beta 1$  抗體及其用途NOVEL ANTI- $\alpha 5 \beta 1$  ANTIBODIES AND USES THEREOF

(57) 摘要

本發明提供新穎抗- $\alpha 5 \beta 1$  抗體、包含該等抗體之組合物及套組、及製造及使用該等抗體之方法。

The present invention provides new anti- $\alpha 5 \beta 1$  antibodies, compositions and kits comprising the antibodies, and methods of making and using the antibodies.

(無元件符號說明)



公告本
-----

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 99108338

※ 申請日： 99.3.23

※IPC 分類：~~C07K~~ A61K 39/395 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

新穎抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體及其用途

C12N15/13 (2006.01)

C07K16/18 (2006.01)

A61P37/00 (2006.01)

NOVEL ANTI- $\alpha 5\beta 1$  ANTIBODIES AND USES THEREOF A61P37/00 (2006.01)

二、中文發明摘要：

本發明提供新穎抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體、包含該等抗體之組合物

及套組、及製造及使用該等抗體之方法。

A61P35/00 (2006.01)

三、英文發明摘要：

The present invention provides new anti-  $\alpha 5\beta 1$  antibodies, compositions and kits comprising the antibodies, and methods of making and using the antibodies.



四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 ( 1 ) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)



## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於新穎 $\alpha_5\beta_1$ 抗體、包含該等抗體之組合物及套組、及使用該等抗體之方法。

本申請案主張2009年3月25日申請的美國臨時專利申請案第61/163241號的權利，其揭示內容係出於所有目的以全文引用的方式併入本文中。

### 【先前技術】

$\alpha_5\beta_1$ 整合素為經由其主要配位體(纖維結合蛋白(fibronectin))介導細胞-ECM相互作用之細胞膜糖蛋白。 $\alpha_5\beta_1$ 整合素在細胞遷移、分化及存活中起作用。在腫瘤血管內皮(例如胃癌、結腸直腸癌、肝細胞癌、子宮頸癌及乳癌)及其他血管生成血管中， $\alpha_5\beta_1$ 整合素之含量升高。 $\alpha_5\beta_1$ 整合素在血管生成期間調節壁內細胞(mural cell)與內皮細胞之締合及內皮細胞外基質的集合。因此， $\alpha_5\beta_1$ 整合素為抑制血管生成及使細胞對VEGF拮抗劑作用敏感化的有用標靶。

因此，此項技術中需要靶向 $\alpha_5\beta_1$ 整合素之組合物及方法。本發明滿足此需要及其他需要。

### 【發明內容】

本發明提供源自單株抗體18C12之新穎抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體、包含該等新穎抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體之套組及組合物、及製造及/或使用其之方法。

本發明之一實施例提供抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體，其包含VL域，該

VL 域 包 含 : 包 含 TL-S/T-S/P/T-Q/N-H-F/S-T/I-Y-K/T-I-G/D/S(SEQ ID NO:15)之 CDR-L1 ; 包 含 L/I-N/T-S-D/H/S-G/S-S/L/T-H/Y-N/K/Q/I-K/T-G/A-D/S/V(SEQ ID NO:16)之 CDR-L2 ; 包 含 G/A-S/A/Y-S/Y-Y-S/A/Y-S/Y/T-GY-V/I(SEQ ID NO:17)之 CDR-L3 ; 及 VH 域 , 該 VH 域 包 含 : 包 含 GFTFS-N/A-RW-I/V-Y(SEQ ID NO:18)之 CDH-H1 ; 包 含 GIKTKP-N/A/T-I/R-YAT-E/Q-YADSVKG(SEQ ID NO:19)之 CDR-H2 ; 及 包 含 L/V-TG-M/K-R/K-YFDY(SEQ ID NO:20)之 CDR-H1 。 在 一 些 實 施 例 中 , 抗- $\alpha_5\beta_1$  抗 體 包 括 包 含 CDR-L1 、 CDR-L2 及 CDR-L3 (各 包 含 圖 3 中 所 述 之 序 列 ) 之 VL 域 及 包 含 CDR-H1 、 CDR-H2 及 CDR-H3 (各 包 含 圖 3 中 所 述 之 序 列 ) 之 VH 域 , 亦 即 , 包 括 包 含 以 SEQ ID NO: 21 、 22 、 23 或 24 所 述 序 列 之 CDR-L1 、 包 含 以 SEQ ID NO: 25 、 26 、 27 或 28 所 述 序 列 之 CDR-L2 及 包 含 以 SEQ ID NO: 29 、 30 、 31 或 32 所 述 序 列 之 CDR-L3 的 VL 域 ; 及 包 括 包 含 以 SEQ ID NO: 34 或 35 所 述 序 列 之 CDR-H1 、 包 含 以 SEQ ID NO: 36 或 37 所 述 序 列 之 CDR-H2 及 包 含 以 SEQ ID NO: 38 、 39 或 40 所 述 序 列 之 CDR-H3 的 VH 域 。 在 一 些 實 施 例 中 , 抗- $\alpha_5\beta_1$  抗 體 包 括 包 含 SEQ ID NO:3-8 中 任 一 序 列 之 VL 域 及 包 含 SEQ ID NO:11-14 中 任 一 序 列 之 VH 域 。 在 一 些 實 施 例 中 , 抗- $\alpha_5\beta_1$  抗 體 包 括 包 含 SEQ ID NO:4 之 VL 域 及 包 含 SEQ ID NO:11 之 VH 域 。 在 一 些 實 施 例 中 , 抗- $\alpha_5\beta_1$  抗 體 包 括 包 含 SEQ ID NO:5 之 VL 域 及 包 含 SEQ ID NO:12 之 VH 域 。 在 一 些 實 施 例 中 , 抗- $\alpha_5\beta_1$  抗 體 包 括 包 含 SEQ ID NO:6 之 VL 域 及 包 含 SEQ

ID NO:13之VH域。在一些實施例中，抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體包括包含SEQ ID NO:7之VL域及包含SEQ ID NO:13之VH域。在一些實施例中，抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體包括包含SEQ ID NO:8之VL域及包含SEQ ID NO:14之VH域。在一些實施例中，抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體為人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體。在一實施例中，抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體為單株抗體。在一些實施例中，抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體與18C12抗體競爭結合至 $\alpha_5\beta_1$ 整合素。在一些實施例中，單株抗體為嵌合抗體。在一些實施例中，抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體為結合 $\alpha_5\beta_1$ 之抗體片段。在一些實施例中，抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體係選自：Fab、Fab'、F(ab)'<sub>2</sub>、單鏈Fv(scFv)、Fv片段；雙功能抗體及線抗體。在一些實施例中，抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體為全長IgG1或全長IgG4。在一些實施例中，抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體為雙特異性抗體或多特異性抗體。在一些實施例中，雙特異性抗體結合VEGF及 $\alpha_5\beta_1$ 且為VEGF拮抗劑。在一些實施例中，抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體具有改變之效應功能。在一些實施例中，抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體經改變以減少或防止抗體依賴性細胞毒性(ADCC)或補體依賴性細胞毒性(CDC)活性(例如藉由改變編碼抗體之Fc部分的核酸序列)。在一些實施例中，抗體之Fc部分包含N297A取代。在一些實施例中，抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體已經修飾以增加或減少其於人類體內之半衰期(例如藉由改變編碼抗體之Fc部分的核酸序列)。在一些實施例中， $\alpha_5\beta_1$ 抗體為與另一實體(例如治療劑或可偵測標記物)結合之免疫結合物的一部分。在一些實施例中，治療實體為細胞毒性劑(例如放射性同位素、毒素、生長抑制劑或化學治療劑)。在

[ S ]

一些實施例中，可偵測標記物為螢光染料、放射性同位素或酶。

本發明之其他實施例提供編碼本文中所述之任何抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體的核酸分子、包含該等核酸之表現載體、及包含該等核酸之宿主細胞。本發明之其他實施例提供產生本文中所述之任何抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體的方法，該等方法包含培養宿主細胞以便產生抗體。在一些實施例中，該等方法進一步包含自宿主細胞回收抗體。

本發明之其他實施例提供包含本發明之 $\alpha_5\beta_1$ 抗體及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。在一些實施例中，醫藥組合物進一步包含至少一種、兩種、三種、四種或四種以上額外藥劑(包括例如 VEGF 拮抗劑)。在一些實施例中，該(等)額外藥劑係選自細胞毒性劑、化學治療劑、生長抑制劑或抗血管生成劑。在一些實施例中，VEGF 拮抗劑為抗-VEGF 抗體。在一些實施例中，抗-VEGF 抗體為貝伐單抗(bevacizumab)。本發明亦提供包含用於偵測 $\alpha_5\beta_1$ (例如在已經 VEGF 拮抗劑治療的個體中)之說明書的製品及套組。

本發明之另一實施例提供治療罹患涉及異常血管生成、血管滲透性或血管滲漏之疾病或病症之個體的方法。該等方法包含向該個體投與治療有效量之本文中所述之抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體，藉此治療該疾病或病症(例如藉由部分或完全地抑制異常血管生成、血管滲透性或血管滲漏)。在一些實施例中，亦向個體投與 VEGF 拮抗劑。在一些實施例中，VEGF 拮抗劑與抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體係同時投與。在一些實施例

中，VEGF拮抗劑與抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體係依序投與。在一些實施例中，疾病或病症對VEGF拮抗劑療法有反應。在一些實施例中，疾病或病症係選自：癌症、免疫疾病或眼疾病。根據一實施例，疾病或病症係選自：實體腫瘤、轉移性腫瘤、軟組織腫瘤、具有眼部新生血管之疾病、具有異常血管生成之發炎疾病、於個體體內移植之後出現的疾病及具有纖維血管組織異常增生之疾病。根據另一實施例，癌症係選自：乳癌(包括轉移性乳癌)、子宮頸癌、結腸直腸癌(包括轉移性結腸直腸癌)、肺癌(包括非小細胞肺癌)、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkins lymphoma, NHL)、慢性淋巴球性白血病、腎細胞癌、前列腺癌(包括激素難治性前列腺癌)、肝癌、頭頸部癌、黑素瘤、卵巢癌、間皮瘤、軟組織癌、胃腸基質腫瘤、多形性膠質母細胞瘤及多發性骨髓瘤。根據另一實施例，疾病係選自：視網膜病、年齡相關之黃斑部變性(例如濕性AMD)、糖尿病性黃斑部水腫、視網膜靜脈阻塞(RVO)、及乾性AMD/地圖狀萎縮(防止濕性AMD進展)虹膜紅變；牛皮癬、發炎性腎臟疾病、溶血性尿毒癥候群、糖尿病性腎病(例如增生性糖尿病性視網膜病)、關節炎(例如牛皮癬性關節炎、骨關節炎、類風濕性關節炎)、發炎性腸病、慢性炎症、慢性視網膜脫離、慢性葡萄膜炎、慢性玻璃體炎、角膜移植排斥反應、角膜新生血管、角膜移植新生血管、克隆氏病(Crohn's disease)、近視、眼部新生血管疾病、佩吉特氏病(Pagets disease)、類天疱瘡、多動脈炎、雷射後放射狀角膜切開



術、視網膜新生血管、休格連氏症候群 (Sogrens syndrome)、潰瘍性結腸炎、移植排斥反應、肺部炎症、腎病症候群、水腫、與惡性疾病有關之腹水、中風、血管纖維瘤及新生血管性青光眼。在一實施例中，方法進一步包含向個體投與額外治療劑(例如抗贅生劑、化學治療劑、生長抑制劑或細胞毒性劑)。

本發明之另一實施例提供治療個體之癌症的方法，該等方法包含：向個體投與治療有效量之 VEGF 拮抗劑及抗- $\alpha_5\beta_1$  抗體。在一些實施例中，VEGF 拮抗劑與抗- $\alpha_5\beta_1$  抗體係同時投與。在一些實施例中，VEGF 拮抗劑與抗- $\alpha_5\beta_1$  抗體係依序投與。在一些實施例中，癌症對 VEGF 拮抗劑療法有反應。

本發明之另一實施例提供治療罹患年齡相關之黃斑部變性 (AMD)(包括例如濕性年齡相關之黃斑部變性)之個體之 AMD 的方法，該等方法包含：向個體投與治療有效量之 VEGF 拮抗劑及抗- $\alpha_5\beta_1$  抗體。在一些實施例中，VEGF 拮抗劑與抗- $\alpha_5\beta_1$  抗體係同時投與。在一些實施例中，VEGF 拮抗劑與抗- $\alpha_5\beta_1$  抗體係依序投與。在另一實施例中，提供一種治療個體之自體免疫疾病的方法，其包含同時或依序投與治療有效量之 VEGF 及  $\alpha_5\beta_1$  拮抗劑的步驟。

在一些實施例中，最初向欲治療之個體投與 VEGF 拮抗劑，且隨後向個體投與抗- $\alpha_5\beta_1$  抗體。在一些實施例中，VEGF 拮抗劑與  $\alpha_5\beta_1$  拮抗劑係同時投與至個體。在一些實施例中，最初向欲治療之個體投與抗- $\alpha_5\beta_1$  抗體，隨後向該個

體投與 VEGF 拮抗劑。在一些實施例中，用 VEGF 拮抗劑治療個體直至個體對 VEGF 拮抗劑治療無反應，且隨後用抗- $\alpha_5\beta_1$  抗體治療個體。在一特定實施例中，當癌症為未侵襲性或早期時，用 VEGF 拮抗劑治療個體，且當癌症為侵襲性時，用抗- $\alpha_5\beta_1$  抗體治療個體。在另一實施例中，經抗- $\alpha_5\beta_1$  抗體治療之個體之患病組織中  $\alpha_5\beta_1$  含量相較來自未罹患疾病之個體的組織或相較非患病組織升高。在此情況下，該方法可進一步包括偵測個體體內(例如用 VEGF 拮抗劑治療後之患病組織中)之  $\alpha_5\beta_1$  之步驟。根據一實施例，侵襲性癌症為轉移癌。根據另一實施例，早期癌症為藉由輔助療法(例如化學療法或外科手術切除)治療之癌症。

根據本發明之一實施例，欲用抗- $\alpha_5\beta_1$  抗體治療之個體在 VEGF 拮抗劑治療後經歷復發或已變得難以用 VEGF 拮抗劑治療治癒。根據另一實施例，欲用抗- $\alpha_5\beta_1$  抗體及 VEGF 拮抗劑治療之個體罹患轉移性癌症或先前已經輔助療法治療。在一實施例中，候選患者對諸如伊立替康(irinotecan)之化學治療劑具復發性、難治性或抗性。此等疾病之實例包括(但不限於)轉移性結腸直腸癌、復發性轉移性結腸直腸癌、轉移性乳癌、復發性轉移性乳癌、轉移性 HER2<sup>+</sup> 乳癌、輔助療法治療之乳癌、輔助療法治療之 HER2<sup>+</sup> 乳癌、轉移性胰腺癌、輔助療法治療之結腸癌、輔助療法治療之非小細胞肺癌、輔助療法治療之直腸癌、輔助療法治療之非小細胞肺癌、轉移性非小細胞肺癌、轉移性卵巢癌、轉移性腎細胞癌及輔助療法治療之腎細胞癌。

根據一實施例，在用 VEGF 拮抗劑治療疾病後向罹患本文中所述之疾病之個體投與維持療法，其中該維持療法為單獨投與  $\alpha_5\beta_1$  拮抗劑或依序或同時投與  $\alpha_5\beta_1$  拮抗劑與 VEGF 拮抗劑。

在一些實施例中，VEGF 拮抗劑係選自：抗體、免疫黏附素、肽體、小分子及在嚴格條件下雜交至編碼 VEGF 之核酸分子的核酸(例如核糖核酸酶、siRNA 及適體)。在一些實施例中，VEGF 拮抗劑為抗體(例如單株抗體)。根據一實施例，抗-VEGF 抗體能夠被 Avastin® 抗體競爭性抑制與人類 VEGF 結合。根據另一實施例，抗-VEGF 抗體為人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體。根據一特定實施例，抗-VEGF 抗體為 Avastin® 抗體。根據另一實施例，抗-VEGF 抗體係選自由 Fab、Fab'、F(ab)'<sub>2</sub>、單鏈 Fv(scFv)、Fv 片段；雙功能抗體及線抗體組成之群。根據另一實施例，VEGF 拮抗劑為結合 VEGF 與  $\alpha_5\beta_1$  之雙特異性抗體且亦為  $\alpha_5\beta_1$  拮抗劑。

本發明之另一實施例提供偵測疑似含有  $\alpha_5\beta_1$  蛋白之樣品中之  $\alpha_5\beta_1$  蛋白的方法。該等方法包含：(1)使本文中所述之抗體與樣品接觸；及偵測抗- $\alpha_5\beta_1$  抗體與  $\alpha_5\beta_1$  蛋白之間之複合物的形成。在一些實施例中，樣品係來自經診斷患有特徵為異常血管生成、異常血管滲透性及/或血管滲漏之疾病的患者。

在以下[實施方式]中進一步描述本發明之此等及其他實施例。

## 【實施方式】

### I. 引言

本發明係基於對結合 $\alpha_5\beta_1$ 整合素之新穎抗體的鑑別。 $\alpha_5\beta_1$ 抗體係源自單株抗體18C12且可用於多種治療及診斷方法中。舉例而言， $\alpha_5\beta_1$ 抗體可單獨使用或與其他藥劑組合使用來治療異常血管生成、瘤形成、眼疾病及自體免疫疾病。抗體亦可藉由在患者中投與 $\alpha_5\beta_1$ 蛋白之抗體且偵測來自患者之樣品中抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體與 $\alpha_5\beta_1$ 蛋白之結合(例如活體內或離體)，或藉由使抗體與來自患者之樣品接觸且定性或定量偵測抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體與 $\alpha_5\beta_1$ 蛋白之結合而用於偵測患者或患者樣品中之 $\alpha_5\beta_1$ 蛋白。

### II. 定義

「 $\alpha_5\beta_1$ 」或「 $\alpha_5\beta_1$ 」或「 $\alpha_5\beta_1$ 」為包含兩種不同蛋白質(亦即，次單位 $\alpha_5$ 及 $\beta_1$ )之整合素。已展示 $\alpha_5\beta_1$ 結合至纖維結合蛋白、L1-CAM及血纖維蛋白原。 $\alpha_5\beta_1$ 整合素亦稱作極遲活化-5(Very Late Activation-5)、VLA-5、 $\alpha_5\beta_1$ 、CD49e/CD29、纖維結合蛋白受體、FNR及GPIIc-IIa。根據一實施例， $\alpha_5\beta_1$ 為人類 $\alpha_5\beta_1$ 。

「 $\alpha_5$ 」在本文中可與CD49e、整合素 $\alpha_5$ 次單位、VLA-5 $\alpha$ 次單位、GPIIc-IIa之IC次單位及FNR $\alpha$ 鏈互換使用，係指 $\alpha_5\beta_1$ 整合素之一個次單位。 $\alpha_5$ 具有四個由替代性剪接產生且可在其細胞質域內不同之同功異型物(A-D)。 $\alpha_5$ 之人類同功異型物之胺基酸序列可分別以例如Genbank寄存編號：X07979、U33879、U33882及U33880發現。

「 $\beta 1$ 」亦稱作CD29、 $\beta 1$ 、血小板GPIIa；VLA- $\beta$ 鏈； $\beta$ -1整合素鏈、CD29；FNRB；MDF2；VLAB；GPIIA；MSK12及VLA5B。人類 $\beta 1$ 之胺基酸序列可以例如Genbank寄存編號X06256發現。

如本文中所用之術語「VEGF」係指165-胺基酸人類血管內皮細胞生長因子及相關121-、189-及206-胺基酸人類血管內皮細胞生長因子(如Leung等人, *Science*, 246:1306 (1989)及Houck等人, *Mol. Endocrin.*, 5:1806 (1991)所述), 以及其天然存在之對偶基因及經處理形式。術語「VEGF」亦係指來自諸如小鼠、大鼠或靈長類動物之非人類物種的VEGF。有時來自特定物種之VEGF係由諸如以下之術語表示: 人類VEGF用hVEGF; 鼠類VEGF用mVEGF等。術語「VEGF」亦用於指包含165-胺基酸人類血管內皮細胞生長因子之胺基酸8至109或1至109之多肽的截短形式。在本申請案中可例如以「VEGF (8-109)」、「VEGF (1-109)」或「VEGF<sub>165</sub>」來鑑別對VEGF之任何此等形式的提及。「截短」天然VEGF之胺基酸位置係如天然VEGF序列中所示進行編號。舉例而言, 截短天然VEGF中之胺基酸位置17(甲硫胺酸)亦為天然VEGF中之位置17(甲硫胺酸)。截短天然VEGF具有與天然VEGF相當的對KDR及Flt-1受體之結合親和力。根據一實施例, VEGF為人類VEGF。

「VEGF拮抗劑」係指能夠中和、阻斷、抑制、消除、降低或干擾VEGF活性(包括其與VEGF或一或多種VEGF受體或編碼其之核酸之結合)之分子。VEGF拮抗劑較佳結合

VEGF 或 VEGF 受體。VEGF 拮抗劑包括抗-VEGF 抗體及其抗原結合片段、結合 VEGF 及 VEGF 受體且阻斷配位體-受體相互作用之多肽(例如免疫黏附素、肽體)、抗-VEGF 受體抗體及 VEGF 受體拮抗劑(諸如 VEGFR 酪胺酸激酶之小分子抑制劑)、結合 VEGF 之適體及在嚴格條件下雜交至編碼 VEGF 或 VEGF 受體之核酸序列之核酸(例如 RNAi)。根據一實施例，VEGF 拮抗劑結合至 VEGF 且活體外抑制 VEGF 誘發之內皮細胞增生。根據一實施例，VEGF 拮抗劑以高於對非 VEGF 或非 VEGF 受體之親和力結合至 VEGF 或 VEGF 受體。根據一實施例，VEGF 拮抗劑以介於 1  $\mu$ M 與 1 pM 之間之 Kd 結合至 VEGF 或 VEGF 受體。根據另一實施例，VEGF 拮抗劑以 500 nM 至 1 pM 結合與 VEGF 或 VEGF 受體。

根據一實施例，VEGF 拮抗劑係選自由諸如抗體、肽體、免疫黏附素、小分子或適體之多肽組成之群。在一實施例中，抗體為抗-VEGF 抗體，諸如 AVASTIN<sup>®</sup> 抗體；或抗-VEGF 受體抗體，諸如抗-VEGFR2 或抗-VEGFR3 抗體。VEGF 拮抗劑之其他實例包括：VEGF-Trap、Mucagen、PTK787、SU11248、AG-013736、Bay 439006(索拉非尼(sorafenib))、ZD-6474、CP632、CP-547632、AZD-2171、CDP-171、SU-14813、CHIR-258、AEE-788、SB786034、BAY579352、CDP-791、EG-3306、GW-786034、RWJ-417975/CT6758 及 KRN-633。

「抗-VEGF 抗體」為以足夠親和力及特異性結合至 VEGF 之抗體。較佳地，本發明之抗-VEGF 抗體可用作用

於靶向且干擾涉及 VEGF 活性之疾病或病狀之治療劑。抗-VEGF 抗體通常不會結合至諸如 VEGF-B 或 VEGF-C 之其他 VEGF 同源物，亦不會結合至諸如 PlGF、PDGF 或 bFGF 之其他生長因子。抗-VEGF 抗體為與融合瘤 ATCC HB 10709 產生之單株抗-VEGF 抗體 A4.6.1 結合至相同抗原決定基的單株抗體。抗-VEGF 抗體更佳為根據 Presta 等人，(1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599 產生的重組人類化抗-VEGF 單株抗體，包括(但不限於)稱作貝伐單抗(BV；Avastin®)之抗體。根據另一實施例，可使用之抗-VEGF 抗體包括(但不限於)WO 2005/012359 中所揭示之抗體。根據一實施例，抗-VEGF 抗體包含 WO 2005/012359 之圖 24、25、26、27 及 29 中所揭示之任一抗體(例如 G6、G6-23、G6-31、G6-23.1、G6-23.2、B20、B20-4 及 B20.4.1)之可變重鏈區及可變輕鏈區。在另一實施例中，稱作蘭尼單抗(ranibizumab)之抗-VEGF 抗體為經投與用於眼疾病(諸如糖尿病性視網膜病及濕性 AMD)之 VEGF 拮抗劑。

抗-VEGF 抗體「貝伐單抗(BV)」(亦稱作「rhuMAb VEGF」或「Avastin®」)為一種根據 Presta 等人，(1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599 產生之重組人類化抗-VEGF 單株抗體。其包含突變型人類 IgG1 構架區及來自阻斷人類 VEGF 與其受體結合之鼠類抗 hVEGF 單株抗體 A.4.6.1 的抗原結合互補決定區。貝伐單抗之胺基酸序列之約 93%(包括大部分構架區)係源自人類 IgG1，且序列之約 7% 係源自鼠類抗體 A4.6.1。貝伐單抗之分子質量為約 149,000 道爾頓

(dalton)且經糖基化。其他抗-VEGF抗體包括美國專利第6,884,879號及WO 2005/044853中所述之抗體。

抗-VEGF抗體蘭尼單抗或LUCENTIS®抗體或rhuFab V2為人類化親和力成熟抗-人類VEGF Fab片段。於大腸桿菌(*E. coli*)表現載體中藉由標準重組技術方法及藉由細菌醱酵產生蘭尼單抗。蘭尼單抗未經糖基化且分子質量為約48,000道爾頓。參見WO 98/45331及U.S. 2003/0190317。

可藉由競爭性抑制/結合檢定來鑑別特徵為與標靶上之重疊或類似區域結合的分子(諸如抗體)。

在一實施例中，於競爭性抑制檢定中使用HUVEC或其他表現 $\alpha_5\beta_1$ 之細胞且使用FACS來評估兩種抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體相對於彼此之結合位置。舉例而言，可於錐形管中洗滌HUVEC細胞且以1000 rpm旋轉5分鐘。通常洗滌小球兩次。隨後，可將細胞再懸浮，計數且保持於冰上直至使用。可向孔中添加100  $\mu$ l第一抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體(例如以1  $\mu$ g/ml濃度或更低濃度開始)。接著，可向每一孔中添加100  $\mu$ l(例如 $20 \times 10^5$ 個細胞)細胞且於冰上培育30分鐘。接著，可向各孔中添加100  $\mu$ l之經結合生物素之抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體(5  $\mu$ g/ml儲備液)且於冰上培育30分鐘。隨後洗滌細胞且在1000 rpm下粒化5分鐘。吸出上清液。將R-藻紅素(R-Phycoerythrin)與抗生蛋白鏈菌素(Jackson 016-110-084)之結合物添加至孔中(100  $\mu$ l，以1:1000)。接著，以箔包裹培養盤且於冰上培育30分鐘。培育後，可將小球洗滌且在1000 rpm下粒化5分鐘。可使小球再懸浮且轉移至微量滴

[ S ]



定管中進行FACS分析。

「血管生成因子或血管生成媒介物」為刺激血管發育(例如促進血管生成、內皮細胞生長、血管穩定性及/或血小管生成等)中所涉及之生長因子或其受體。舉例而言,血管生成因子包括(但不限於)例如VEGF及VEGF家族成員及其受體(VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGFR1、VEGFR2及VEGFR3)、PlGF、PDGF家族、纖維母細胞生長因子家族(FGF)、TIE配位體(促血管生成素、ANGPT1、ANGPT2)、TIE1、TIE2、蝶素(ephrin)、Bv8、Delta樣配位體4(DLL4)、Del-1、纖維母細胞生長因子(酸性(aFGF)及鹼性(bFGF)、FGF4、FGF9)、BMP9、BMP10、卵泡抑素(Follistatin)、顆粒球群落刺激因子(G-CSF)、GM-CSF、肝細胞生長因子(HGF)/分散因子(SF)、介白素-8(IL-8)、CXCL12、瘦素(Leptin)、中期因子(Midkine)、神經纖毛蛋白(neuropilin)、NRP1、NRP2、胎盤生長因子、血小板衍生之內皮細胞生長因子(PD-ECGF)、血小板衍生之生長因子(尤其PDGF-BB、PDGFR- $\alpha$ 或PDGFR- $\beta$ )、多效生長因子(Pleiotrophin)(PTN)、前顆粒蛋白(Progranulin)、增殖蛋白(Proliferin)、轉化生長因子- $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )、轉化生長因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、腫瘤壞死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、Alk1、CXCR4、Notch1、Notch4、Sema3A、Sema3C、Sema3F、Robo4等。其將進一步包括促進血管生成之因子,諸如ESM1及珍珠素(Perlecan)。其亦將包括加速創傷癒合之因子,諸如生長激素、類胰島素生長因子-I(IGF-I)、VIGF、表皮生

長因子(EGF)、EGF樣結構域7(EGF-like domain, multiple 7, EGFL7)、CTGF及其家族成員，及TGF- $\alpha$ 及TGF- $\beta$ 。參見例如 Klagsbrun及 D'Amore (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39；Streit及 Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179；Ferrara及 Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5(12):1359-1364；Tonini等人，(2003) *Oncogene* 22:6549-6556(例如列出已知血管生成因子之表1)；及 Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206。

「抗血管生成劑」或「血管生成抑制劑」係指直接或間接地抑制血管生成、血小管生成或不當之血管滲透性的小分子量物質、聚核苷酸(包括例如抑制性RNA(RNAi或siRNA))、多肽、經分離蛋白、重組蛋白、抗體或其結合物或融合蛋白。應瞭解，抗血管生成劑包括結合血管生成因子或其受體且阻斷其血管生成活性的彼等藥劑。舉例而言，抗血管生成劑為如上所定義之血管生成媒介物之抗體或其他拮抗劑，例如 VEGF-A或 VEGF-A受體(例如 KDR受體或 Flt-1受體)之抗體、抗-PDGFR抑制劑、阻斷 VEGF受體信號傳導之小分子(例如 PTK787/ZK2284、SU6668、SUTENT®/SU11248(蘋果酸舒尼替尼(sunitinib malate))、AMG706、或例如國際專利申請案 WO 2004/113304中所述者)。抗血管生成劑包括(但不限於)以下藥劑：VEGF抑制劑(諸如 VEGF特異性拮抗劑)、EGF抑制劑、EGFR抑制劑、Erbbitux®(西妥昔單抗(cetuximab)，ImClone Systems, Inc., Branchburg, N.J.)、Vectibix®(帕尼單抗(panitumumab)，

[ S ]

Amgen, Thousand Oaks, CA)、TIE2抑制劑、IGF1R抑制劑、COX-II(環加氧酶II)抑制劑、MMP-2(基質-金屬蛋白酶2)抑制劑、及MMP-9(基質-金屬蛋白酶9)抑制劑、CP-547,632(Pfizer Inc., NY, USA)、阿西替尼(Axitinib)(Pfizer Inc.; AG-013736)、ZD-6474(AstraZeneca)、AEE788(Novartis)、AZD-2171、VEGF Trap(Regeneron/Aventis)、瓦他拉尼(Vatalanib)(亦稱作PTK-787、ZK-222584: Novartis & Schering A G)、Macugen(哌加他尼八鈉鹽(pegaptanib octasodium)、NX-1838、EYE-001, Pfizer Inc./Gilead/Eyetech)、IM862 (Cytran Inc., Kirkland, Wash., USA); 及血管酶(angiozyme), 其為一種來自Ribozyme(Boulder, Colo.)及Chiron(Emeryville, Calif.)之合成核糖核酸酶; 及其組合。其他血管生成抑制劑包括血小板反應蛋白1(thrombospondin1)、血小板反應蛋白2、膠原蛋白IV及膠原蛋白XVIII。VEGF抑制劑揭示於美國專利第6,534,524號及第6,235,764號中, 兩者均出於所有目的全文併入本文中。抗血管生成劑亦包括天然血管生成抑制劑, 例如血管抑制素(angiostatin)、內皮抑制素(endostatin)等。參見例如Klagsbrun及D'Amore (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39; Streit及Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179(例如列出對惡性黑素瘤之抗血管生成療法的表3); Ferrara及Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5(12):1359-1364; Tonini等人, (2003) *Oncogene* 22:6549-6556(例如列出已知抗血管生成因子之表2); 及Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-

206(例如列出臨床試驗中使用之抗血管生成劑的表1)。

術語「抗血管生成療法」係指適用於抑制血管生成之療法，其包含投與抗血管生成劑。

在一實施例中，抗體(本發明之抗-VEGF抗體)之「Kd」或「Kd值」係藉由如量測Fab對VEGF之溶液結合親和力之以下檢定所述以抗體之Fab形式及VEGF分子進行的經放射性標記之VEGF結合檢定(RIA)來量測，或藉由在滴定系列之未經標記VEGF存在下使Fab與最小濃度之經( $^{125}\text{I}$ )標記之分子VEGF(109)平衡，隨後用經抗-Fab抗體塗布之培養盤捕捉經結合VEGF來量測(Chen等人，(1999) *J. Mol Biol* 293:865-881)。為確立檢定條件，將微量滴定盤(Dynex)以含5  $\mu\text{g/ml}$ 捕捉抗-Fab抗體(Cappel Labs)之50 mM碳酸鈉(pH 9.6)塗布隔夜，且隨後在室溫(約23°C)下以2%(w/v)含牛血清白蛋白之PBS阻斷兩小時至五小時。在非吸附性培養盤(Nunc #269620)中，將100 pM或26 pM [ $^{125}\text{I}$ ]VEGF(109)與相關Fab(例如Fab-12(Presta等人，(1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599))之連續稀釋液混合。隨後培育相關Fab隔夜；然而，培育可持續65小時以確保達到平衡。此後，將混合物轉移至捕捉培養盤中且在室溫下培育1小時。接著移除溶液且用含0.1% Tween-20之PBS洗滌培養盤8次。當培養盤乾燥時，添加每孔150  $\mu\text{l}$ 閃爍體(MicroScint-20; Packard)，且以Topcount  $\gamma$ 計數器(Packard)對培養盤計數10分鐘。選擇提供小於或等於20%最大結合之各Fab濃度用於競爭性結合檢定。根據另一實施例，在25°C，藉由利用

使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)之表面電漿共振檢定，使用約10回應單位(RU)之固定標靶分子hVEGF (8-109) CM5晶片來量測Kd或Kd值。簡言之，根據供應商之說明書用N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-羥基丁二醯亞胺(NHS)活化羧甲基化聚葡萄糖生物感測晶片(CM5, BIAcore Inc.)。用10 mM乙酸鈉(pH 4.8)將人類VEGF稀釋至5 µg/ml(約0.2 µM)，接著以每分鐘5 µl之流動速率注射以達成大約10個回應單位(RU)之偶聯蛋白。注射人類VEGF後，注射1 M乙醇胺以阻斷未反應之基團。為進行動力學量測，在25°C下以大約25 µl/min之流動速率將Fab之兩倍連續稀釋液(0.78 nM至500 nM)注入含有0.05% Tween 20之PBS(PBST)中。使用簡單的一對一朗繆耳結合模型(Langmuir binding model)(BIAcore評估軟體3.2版)藉由同時擬合締合與解離感測器圖譜來計算締合速率( $k_{on}$ )及解離速率( $k_{off}$ )。以比率 $k_{off}/k_{on}$ 之形式計算平衡解離常數(Kd)。參見例如Chen, Y.等人, (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881。若根據上文表面電漿共振檢定之締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ，則締合速率可藉由使用螢光淬滅技術來測定，該螢光淬滅技術如光譜儀(諸如裝備有終止-流動之光譜儀(Aviv Instruments)或具有攪拌光析管之8000系列SLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic))所量測在增加濃度之人類VEGF短形式(8-109)或小鼠VEGF存在下，量測在25°C下20 nM 抗-VEGF抗體(Fab形式)之PBS溶液(pH 7.2)之螢光發射

強度(激發=295 nm；發射=340 nm，16 nm帶通)增加或減低。可進行類似結合檢定來測定抗- $\alpha 5\beta 1$  Fab或使用 $\alpha 5\beta 1$ 作為標靶之抗體的Kd。

如本文中所用，欲治療之個體為哺乳動物(例如人類、非人類靈長類動物、大鼠、小鼠、牛、馬、豬、綿羊、山羊、犬、貓等)。個體可為臨床患者、臨床試驗志願者、實驗動物等。個體可能疑似患有癌症、免疫疾病或具有異常血管生成之任何其他疾病，或具有患該等疾病之風險；可能經診斷患有癌症、免疫疾病或具有異常血管生成之任何其他疾病。此項技術中已知對於癌症、免疫疾病或展現異常血管生成之任何其他疾病的許多診斷方法及彼等疾病之臨床描述。根據一實施例，根據本發明欲治療之個體為人類。

「異常血管生成」發生在新血管過度生長或在其他方面不當生長(例如根據醫學觀點血管生成之位置、時序、程度或發作不當)時(患病狀態或使產生患病狀態)。在一些情況下，過度、不受控制或在其他方面不當之血管生成發生在促進患病狀態惡化或造成患病狀態之新血管生長存在時，諸如在癌症，尤其血管形成性實體腫瘤及轉移性腫瘤(包括結腸癌、肺癌(尤其小細胞肺癌)或前列腺癌)；由眼部新生血管引起之疾病，尤其糖尿病性失明、視網膜病(主要是糖尿病性視網膜病)或年齡相關之黃斑部變性、脈絡膜新生血管(CNV)、糖尿病性黃斑部水腫、病理性近視、von Hippel-Lindau病、眼睛組織漿菌病、中樞視網膜

靜脈阻塞(CRVO)、角膜新生血管、視網膜新生血管及虹膜紅變；牛皮癬、牛皮癬性關節炎、血管母細胞瘤(諸如血管瘤)；發炎性腎臟疾病，諸如絲球體腎炎(尤其腎小球膜增生性絲球體腎炎)、溶血性尿毒癥候群、糖尿病性腎病或高血壓腎硬化；各種發炎疾病，諸如關節炎(尤其類風濕性關節炎)、發炎性腸病、牛皮癬、類肉瘤病、動脈硬化及移植後出現之疾病、子宮內膜異位或慢性哮喘及超過70種其他病狀中。新血管可供養患病組織，破壞正常組織，且在癌症之情況下，新血管可允許腫瘤細胞逃逸至循環中且進駐其他器官中(腫瘤轉移)。本發明涵蓋治療具有發生上述疾病之風險的彼等患者。

「異常血管滲透性」發生在血管與血管外隔區之間的流體、分子(例如離子及營養素)及細胞(例如淋巴細胞)之流動過度或在其他方面不當(例如根據醫學觀點血管滲透位置、時序、程度或發作不當)時(患病狀態或使產生患病狀態)。異常血管滲透性可導致離子、水、營養素或細胞通過血管結構之「滲漏」過度或在其他方面不當。在一些情況下，過度、不受控制或在其他方面不當之血管滲透性或血管滲漏加劇或誘發疾病狀態，包括例如與腫瘤相關之水腫，包括例如腦腫瘤；與惡性疾病相關之腹水；梅格斯氏症候群(Meigs' syndrome)；肺部炎症；腎病症候群；心包積液；肋膜積液；與心血管疾病相關之滲透性，諸如心肌梗塞及中風後之病狀及其類似疾病。本發明涵蓋治療已發生與異常血管滲透性或滲漏相關之疾病及病症或具有患該

等疾病及病症之風險的彼等患者。

作為接受本發明之抗體或多肽之候選者的其他患者患有以下疾病或具有患以下疾病之風險：纖維血管組織異常增生、痤瘡、後天性免疫不全症候群、動脈阻塞、異位性角膜炎、細菌性潰瘍、貝賽特氏病(Bechets disease)、血源性腫瘤、頸動脈阻塞性疾病、脈絡膜新生血管、慢性炎症、慢性視網膜脫離、慢性葡萄膜炎、慢性玻璃體炎、隱形眼鏡超戴症、角膜移植排斥反應、角膜新生血管、角膜移植新生血管、克隆氏病、伊爾斯氏病(Eales disease)、流行性角膜結膜炎、真菌性潰瘍、單純疱疹感染、帶狀疱疹感染、高血黏稠度症候群(hyperviscosity syndrome)、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、白血病、脂質變性、萊姆氏病(Lyme's disease)、邊緣性角質層分離、莫倫氏潰瘍(Mooren ulcer)、除麻風病外之分枝桿菌(Mycobacteria)感染、近視、眼部新生血管疾病、視盤小凹(optic pits)、奧斯勒-韋伯症候群(Osler-Weber syndrome)(Osler-Weber-Rendu)、骨關節炎、佩吉特氏病、睫狀體平坦部炎、類天疱瘡、匍性角結膜病、多動脈炎、雷射後併發症、原生動物感染、彈性纖維偽黃瘤(pseudoxanthoma elasticum)、翼狀胬肉乾性角膜炎(ptyerygium keratitis sicca)、放射狀角膜切開術、視網膜新生血管、早產兒視網膜病、晶狀體後纖維組織增生、類肉瘤、鞏膜炎、鐮狀細胞貧血症、休格連氏症候群、實體腫瘤、斯特格氏病(Stargarts disease)、史蒂芬強生病(Steven's Johnson disease)、上輪部角膜炎



(superior limbic keratitis)、梅毒、全身性狼瘡、特芮安氏角膜邊緣變性(Terrien's marginal degeneration)、弓蟲病、外傷、尤文氏肉瘤(tumors of Ewing sarcoma)、神經母細胞瘤、骨肉瘤、視網膜母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、潰瘍性結腸炎、靜脈阻塞、維生素A缺乏及韋格納氏類肉瘤病(Wegeners sarcoidosis)、與糖尿病相關之不良血管生成、寄生蟲病、異常創傷癒合、外科手術後肥大、損傷或外傷、毛髮生長抑制、排卵及黃體形成抑制、植入抑制及子宮內胚胎發育抑制。

抗血管生成療法適用於以下疾病之一般治療：移植排斥反應；肺部炎症；腎病症候群；子癩前症；心包積液(諸如與心包炎相關之心包積液)；及肋膜積液；特徵為不良血管滲透性或滲漏之疾病及病症，例如與包括例如腦腫瘤之腫瘤相關的水腫、與惡性疾病相關之腹水、梅格斯氏症候群、肺部炎症、腎病症候群、心包積液、肋膜積液、與心血管疾病相關之滲透性(諸如心肌梗塞及中風後病狀)；及其類似疾病。

根據本發明之其他血管生成相關性疾病包括血管纖維瘤(易於出血之異常血管)、新生血管性青光眼(眼中血管生長)、動靜脈畸形(動脈與靜脈之間異常連通)、不癒合骨折(不會癒合之骨折)、動脈粥樣硬化斑(動脈硬化)、化膿性肉芽腫(由血管構成之常見皮膚病變)、硬皮病(結締組織疾病之一種形式)、血管瘤(由血管構成之腫瘤)、沙眼(第三世界中失明之主要誘因)、血友病性關節、血管黏著及肥

厚性疤痕(異常疤痕形成)。

如本文中所用，「治療」(及其語法變形)係指投與化合物或醫藥組合物用於預防及/或治療目的。「治療疾病」或用於「治療性處理」係指向已罹患疾病之個體投與治療以改良個體之病狀。理想的治療效果包括(但不限於)預防疾病再發、減輕症狀、減少疾病之任何直接或間接病理性後果、預防癌轉移、降低疾病進展之速率、改善或減緩疾病狀態，及症狀緩解或預後改良。在一些實施例中，本發明之抗體係用於延遲疾病之發展或減緩疾病之進展。較佳地，基於對下文所述任何特徵性症狀的鑑別或使用本文中所述之診斷方法，診斷個體罹患具有異常血管生成之疾病。「預防疾病」係指對於尚未生病、但易患特定疾病或具有患特定疾病風險之個體的預防性處理。較佳地，使用本文中所述之診斷方法，確定個體具有患具有異常血管生成之疾病的風險。

「治療或改善」意謂在病狀發作之前或之後改善病狀或病狀之症狀。如由任何標準技術所量測，相較相等之未經治療之對照者，此改善或治療程度為至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%。

術語「再發」、「復發」或「復發性」係指癌症或疾病在臨床評定疾病消失後重現。遠處轉移或局部再發之診斷可視作復發。

「難治性」係指疾病或病狀對於治療有抗性或無反應

[ S ]

(例如贅生性漿細胞之數目即使在給予治療後亦增加)。在某些實施例中，術語「難治性」係指對於任何先前治療(包括(但不限於)VEGF拮抗劑、抗血管生成劑及化學療法治療)有抗性或無反應。在某些實施例中，術語「難治性」係指疾病或病狀對於任何先前治療(包含VEGF拮抗劑、抗血管生成劑及/或化學療法治療)固有地無反應。在某些實施例中，VEGF拮抗劑為抗-VEGF抗體。

「復發性」係指患者之疾病回歸至其先前患病狀態，尤其為在明顯恢復或部分恢復後之症狀重現。在某些實施例中，復發性狀態係指在先前治療(包括(但不限於)VEGF拮抗劑、抗血管生成劑及/或化學療法治療)之前重現疾病之過程。在某些實施例中，復發性狀態係指在對癌症療法(包含VEGF拮抗劑、抗血管生成劑及/或化學療法治療)的初始強烈反應之後重現疾病之過程。在某些實施例中，VEGF拮抗劑為抗-VEGF抗體。

術語「輔助療法」係指在主要療法(通常外科手術)後給予之治療。癌症或疾病之輔助療法可包括免疫療法、化學療法、放射療法或激素療法。

術語「維持療法」係指所給予之幫助維持先前治療效果之定期再治療。通常給予維持療法以幫助無關疾病進展地保持癌症消退或延長對特定療法之反應。

術語「侵襲性癌症」係指擴散至組織層以外開始進入至周圍正常組織中之癌症。侵襲性癌症可為或可不為轉移性。

術語「未侵襲性癌症」係指極早期癌症或未擴散至起源組織以外之癌症。

腫瘤學中之術語「無進展存活」係指在治療期間及治療後，癌症不生長之時間長度。無進展存活包括患者經歷完全反應或部分反應之時間量，以及患者經歷穩定疾病之時間量。

腫瘤學中之術語「進展性疾病」可指自治療開始起歸因於腫瘤質量增加或擴散腫瘤生長超過20%。

「病症」為將受益於使用抗體治療之任何病狀。舉例而言，哺乳動物罹患異常血管生成(過度、不當或不受控制之血管生成)或異常血管滲透性或滲漏，或需要預防該等病狀。此包括慢性及急性病症或疾病，包括使哺乳動物易患所述病症之彼等病理性病狀。本文中欲治療之病症之非限制性實例包括惡性及良性腫瘤；非白血病及淋巴惡性疾病；神經元、神經膠質、星形細胞、下丘腦及其他腺體、巨噬細胞、上皮、基質及囊胚腔病症；及發炎性、血管生成及免疫學病症。

術語「癌症」及「癌性」係指或描述特徵通常為細胞生長失調之哺乳動物生理學病狀。癌症之實例包括(但不限於)癌瘤、淋巴瘤、母細胞瘤、肉瘤及白血病。此等癌症之更特定實例包括鱗狀細胞癌、膠質母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌、唾液腺癌、腎癌、腎臟癌、前列腺癌、陰門癌、甲狀腺癌、肝癌、頭頸部癌、直腸癌、

[ S ]

結腸直腸癌、肺癌(包括小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌及肺鱗狀癌)、鱗狀細胞癌(例如上皮鱗狀細胞癌)、前列腺癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌(包括胃腸癌)、胰腺癌、膠質母細胞瘤、視網膜母細胞瘤、星形細胞瘤、卵泡膜細胞瘤、卵巢男胚瘤(arrhenoblastoma)、肝細胞瘤、血液科惡性疾病(包括非霍奇金淋巴瘤(NHL)、多發性骨髓瘤及急性血液科惡性疾病)、子宮內膜癌或子宮癌、子宮內膜異位、纖維肉瘤、絨膜癌、唾液腺癌、陰門癌、甲狀腺癌、食道癌、肝癌、肛門癌、陰莖癌、鼻咽癌、喉癌、卡波西氏肉瘤、黑素瘤、皮膚癌、神經鞘瘤、少枝膠質瘤、神經母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、骨肉瘤、平滑肌肉瘤、泌尿道癌、甲狀腺癌、威爾姆斯腫瘤(Wilm's tumor)，以及B細胞淋巴瘤(包括低級/濾泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)；小淋巴球性(SL)NHL；中級/濾泡性NHL；中級彌漫性NHL；高級免疫母細胞NHL；高級淋巴母細胞NHL；高級小型無裂細胞NHL；巨大腫瘤NHL；套細胞淋巴瘤；AIDS相關淋巴瘤；及瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's Macroglobulinemia))；慢性淋巴球性白血病(CLL)；急性淋巴母細胞白血病(ALL)；毛細胞白血病；慢性骨髓母細胞白血病；及移植後淋巴組織增生病症(PTLD)，以及與母斑細胞病相關之異常血管增生，及梅格斯氏症候群。

如本文中所用，「腫瘤」係指惡性或良性之所有贅生性細胞生長及增生，及所有癌前及癌性細胞及組織。

術語「抗贅生性組合物」或「抗贅生劑」係指適用於治

療癌症之包含至少一種活性治療劑(例如「抗癌劑」)的組合物。治療劑(抗癌劑)之實例包括(但不限於)例如化學治療劑；生長抑制劑；細胞毒性劑；放射療法中使用之藥劑；抗血管生成劑；細胞凋亡劑；抗微管蛋白劑；及治療癌症之其他藥劑，諸如抗-HER-2抗體、抗-CD20抗體、表皮生長因子受體(EGFR)拮抗劑(例如酪胺酸激酶抑制劑)、HER1/EGFR 抑制劑(例如埃羅替尼(erlotinib)(Tarceva™))、血小板衍生之生長因子抑制劑(例如Gleevec™(甲磺酸伊馬替尼(Imatinib Mesylate)))、COX-2抑制劑(例如塞內昔布(celecoxib))、干擾素、細胞激素、與一或多個以下標靶ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR-β、BAFF、BR3、APRIL、BCMA或VEGF受體結合之拮抗劑(例如中和抗體)、TRAIL/Apo2，及其他生物活性及有機化學劑等。本發明中亦涵蓋其組合。

本文中使用的「生長抑制劑」係指活體外及/或活體內抑制細胞生長或增生之化合物或組合物。因此，生長抑制劑可為顯著減少S期細胞百分比之藥劑。生長抑制劑之實例包括阻斷細胞週期進程(S期外之其他時期)之藥劑，諸如誘導G1停滯及M期停滯之藥劑。經典M期阻斷劑包括長春花屬(vincas)(長春新鹼(vincristine)及長春鹼(vinblastine))；TAXOL®；及topo II抑制劑，諸如小紅莓(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、道諾黴素(daunorubicin)、依託泊苷(etoposide)及博萊黴素(bleomycin)。使G1停滯之藥劑亦連帶引起S期停滯，例如

[ S ]

DNA 烷化劑，諸如他莫昔芬 (tamoxifen)、潑尼松 (prednisone)、達卡巴嗪 (dacarbazine)、二氯甲二乙胺 (mechlorethamine)、順鉑 (cisplatin)、甲胺喋呤 (methotrexate)、5-氟尿嘧啶及 ara-C。其他資訊可見於 The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及Israel編，第1章，標題“Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs”，Murakami等人，(WB Saunders: Philadelphia, 1995)，尤其第13頁。

本文中所用之術語「細胞毒性劑」係指抑制或阻止細胞功能及/或引起細胞破壞之物質。該術語意欲包括放射性同位素(例如 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 及 $Re^{186}$ )；生長抑制劑；化學治療劑；及毒素，諸如細菌、真菌、植物或動物來源之酶活性毒素，或其片段。

「化學治療劑」為適用於治療癌症之化合物。化學治療劑之實例包括適用於治療癌症之化合物。化學治療劑之實例包括：烷化劑，諸如塞替派 (thiotepa)及CYTOXAN®環磷醯胺 (cyclophosphamide)；烷基磺酸鹽類，諸如白消安 (busulfan)、英丙舒凡 (improsulfan)及哌泊舒凡 (pipsulfan)；氮丙啶類，諸如苯佐多巴 (benzodopa)、卡波醌 (carboquone)、米特多巴 (meturedopa)及尤利多巴 (uredopa)；伸乙基亞胺類及甲基三聚氰胺類，包括六甲密胺 (altretamine)、三伸乙基三聚氰胺 (triethylenemelamine)、三伸乙基磷醯胺 (triethylenephosphoramidate)、三伸乙基硫代磷醯胺

(triethylenethiophosphoramidate) 及 三 羥 甲 三 聚 氰 胺 (trimethylololomelamine)；乙醯精寧 (acetogenins) (尤其布拉他辛 (bullatacin) 及 布拉他辛酮 (bullatacinone))；喜樹鹼 (camptothecin) (包括合成類似物拓朴替康 (topotecan))；苔蘚蟲素 (bryostatin)；卡利他汀 (callystatin)；CC-1065 (包括其阿多來新 (adozelesin)、卡折來新 (carzelesin) 及 比折來新 (bizelesin) 合成類似物)；自念珠藻環肽 (cryptophycin) (尤其自念珠藻環肽 1 及 自念珠藻環肽 8)；海兔毒素 (dolastatin)；多卡米辛 (duocarmycin) (包括合成類似物，KW-2189 及 CB1-TM1)；艾榴素 (eleutherobin)；水鬼蕉鹼 (pancratistatin)；沙考的汀 (sarcodictyin)；海綿他汀 (spongistatin)；氮芥類，諸如苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、萘氮芥 (chlornaphazine)、環磷醯胺、雌莫司汀 (estramustine)、異環磷醯胺 (ifosfamide)、二氯甲基二乙胺、鹽酸二氯甲基二乙胺氧化物、美法侖 (melphalan)、新氮芥 (novembichin)、膽固醇對苯乙酸氮芥 (phenesterine)、潑尼莫司汀 (prednimustine)、曲洛磷胺 (trofosfamide)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard)；亞硝基脲類，諸如卡莫司汀 (carmustine)、氯脲黴素 (chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine) 及 拉甯司汀 (ranimustine)；抗生素類，諸如烯二炔抗生素 (例如卡奇黴素 (calicheamicin)，尤其卡奇黴素  $\gamma$ II 及 卡奇黴素  $\omega$ II (參見例如 Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))；達內黴素 (dynemicin)，包括達內黴素 A；雙磷酸



鹽類，諸如氯屈膦酸鹽 (clodronate)；埃斯培拉黴素 (esperamicin)；以及新制癌菌素 (neocarzinostatin) 發色團及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團)、阿克拉黴素 (aclacinomysins)、放線菌素 (actinomycin)、奧斯拉米辛 (authramycin)、偶氮絲胺酸 (azaserine)、博萊黴素、放線菌素 C (cactinomycin)、卡拉比辛 (carabycin)、洋紅黴素 (carminomycin)、嗜癌黴素 (carzinophilin)、色黴素 (chromomycinis)、放線菌素 D (dactinomycin)、道諾黴素、地托比星 (detorubicin)、6-重氮-5-側氧基 (oxo)-L-正白胺酸、ADRIAMYCIN® 小紅莓 (包括 (N-嗎啉基)-小紅莓、氮基 (N-嗎啉基)-小紅莓、2-(N-吡咯啉基)-小紅莓及去氧小紅莓 (deoxydoxorubicin))、表柔比星、依索比星 (esorubicin)、黃膽素 (idarubicin)、麻西羅黴素 (marcellomycin)、絲裂黴素 (mitomycin) (諸如絲裂黴素 C)、黴酚酸 (mycophenolic acid)、諾拉黴素 (nogalamycin)、橄欖黴素 (olivomycin)、培洛黴素 (peplomycin)、泊非黴素 (potfiromycin)、嘌呤黴素 (puromycin)、三鐵阿黴素 (quelamycin)、羅多比星 (rodorubicin)、鏈黑菌素 (streptonigrin)、鏈脲佐菌素 (streptozocin)、殺結核菌素 (tubercidin)、烏苯美司 (ubenimex)、淨司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin)；抗代謝物，諸如甲胺喋呤及 5-氟尿嘧啶 (5-FU)；葉酸類似物，諸如迪諾特寧 (denopterin)、甲胺喋呤、蝶羅呤 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如

氟達拉濱 (fludarabine)、6-巯基嘌呤 (6-mercaptopurine)、  
 噻咪嘌呤 (thiamiprine)、硫鳥嘌呤 (thioguanine)；嘧啶類似  
 物，諸如安西他濱 (ancitabine)、阿紮胞苷 (azacitidine)、6-  
 氮雜尿苷 (6-azauridine)、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷  
 (cytarabine)、雙脫氧尿苷 (dideoxyuridine)、去氧氟尿苷  
 (doxifluridine)、依諾他濱 (enocitabine)、氟尿苷  
 (floxuridine)；雄激素，諸如卡普甾酮 (calusterone)、屈他  
 雄酮丙酸酯 (dromostanolone propionate)、環硫雄醇  
 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、甾內酯  
 (testolactone)；抗腎上腺劑，諸如胺魯米特  
 (aminoglutethimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦  
 (trilostane)；葉酸補充劑，諸如夫羅林酸 (frolinic acid)；  
 醋葡內酯 (aceglatone)；醛磷醯胺糖苷 (aldophosphamide  
 glycoside)；胺基乙醯丙酸 (aminolevulinic acid)；恩尿嘧  
 啶 (eniluracil)；安吡啶 (amsacrine)；貝司他布  
 (bestrabucil)；比生群 (bisantrene)；艾達曲卡  
 (edatraxate)；得弗伐胺 (defofamine)；秋水仙胺  
 (demecolcine)；地吡醯 (diaziquone)；艾弗尼辛  
 (elfornithine)；依利醋銨 (elliptinium acetate)；埃坡徽素  
 (epothilone)；依託格魯 (etoglucid)；硝酸鎂 (gallium  
 nitrate)；羥基脲 (hydroxyurea)；蘑菇多糖 (lentinan)；羅尼  
 代寧 (lonidainine)；類美登素 (maytansinoid)，諸如美登素  
 (maytansine) 及美登木素 (ansamitocins)；米托胍脲  
 (mitoguazone)；米托蔥醯 (mitoxantrone)；莫比達摩

(mopidanmol) ; 硝爾靈 (nitraerine) ; 噴司他丁 (pentostatin) ; 蛋胺氮芥 (phenamet) ; 吡柔比星 (pirarubicin) ; 洛索蔥醌 (losoxantrone) ; 足葉草酸 (podophyllinic acid) ; 2-乙基醯肼 (2-ethylhydrazide) ; 丙卡巴肼 (procarbazine) ; PSK® 多醣複合物 (JHS Natural Products, Eugene, OR) ; 雷佐生 (razoxane) ; 根黴菌素 (rhizoxin) ; 西佐喃 (sizofiran) ; 鍺螺胺 (spirogermanium) ; 細交鏈孢菌酮酸 (tenuazonic acid) ; 三亞胺醌 (triaziquone) ; 2,2',2"-三氯三乙胺 ; 單端孢黴烯族毒素 (trichothecenes)(尤其 T-2 毒素、韋拉庫林 A (verracurin A)、桿孢菌素 A (roridin A) 及安奎定 (anguidine)) ; 烏拉坦 (urethan) ; 長春地辛 (vindesine) ; 達卡巴嗪 ; 甘露莫司汀 (mannomustine) ; 二溴甘露醇 (mitobronitol) ; 二溴衛矛醇 (mitolactol) ; 哌泊溴烷 (pipobroman) ; 伽托辛 (gacytosine) ; 阿拉伯糖苷 (arabinoside)(「Ara-C」) ; 環磷醯胺 ; 塞替派 ; 紫杉醇 (taxoids), 例如 TAXOL® 太平洋紫杉醇 (paclitaxel)(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、無 ABRAXANETM Cremophor 之太平洋紫杉醇之白蛋白工程改造奈米粒子調配物 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)、及 TAXOTERE® 多西他賽 (doxetaxel)(Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France) ; 克羅南布 (chloranbucil) ; GEMZAR® 吉西他濱 (gemcitabine) ; 6-硫鳥嘌呤 (6-thioguanine) ; 巯基嘌呤 ; 甲胺喋呤 ; 鉑類似物, 諸如順鉑及卡鉑 (carboplatin) ; 長春鹼 ; 鉑 ; 依託泊

苷 (VP-16) ; 異環磷醯胺 ; 米托蒽醌 ; 長春新鹼 ; NAVELBINE® 長春瑞賓 (vinorelbine) ; 諾凡特龍 (novantrone) ; 替尼泊甙 (teniposide) ; 依達曲沙 (edatrexate) ; 道諾黴素 ; 胺基喋呤 ; 希羅達 (xeloda) ; 伊班膦酸鹽 (ibandronate) ; 伊立替康 (Camptosar, CPT-11) (包括伊立替康與 5-FU 及甲醯四氫葉酸 (leucovorin) 之治療方案) ; 拓撲異構酶抑制劑 RFS 2000 ; 二氟甲基鳥胺酸 (difluoromethylornithine) (DMFO) ; 類視黃素類, 諸如視黃酸 (retinoic acid) ; 卡培他濱 (capecitabine) ; 考布他汀 (combretastatin) ; 甲醯四氫葉酸 (LV) ; 奧沙利鉑 (oxaliplatin), 包括奧沙利鉑治療方案 (FOLFOX) ; 降低細胞增生之 PKC- $\alpha$ 、Raf、H-Ras 及 EGFR 之抑制劑 (例如埃羅替尼 (Tarceva™)) ; 及任何上述物質之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

化學治療劑亦包括用以調控或抑制對腫瘤之激素作用之抗激素劑, 諸如抗雌激素及選擇性雌激素受體調節劑 (SERM), 包括例如他莫昔芬 (包括 NOLVADEX® 他莫昔芬)、雷諾昔酚 (raloxifene)、屈洛昔芬 (droloxifene)、4-羥基他莫昔芬、曲沃昔芬 (trioxifene)、雷洛昔芬 (keoxifene)、LY117018、奧那司酮 (onapristone) 及弗瑞斯錠 (toremifene) ; 抑制調控腎上腺中之雌激素產生之芳香酶之芳香酶抑制劑, 諸如 4(5)-咪唑、胺魯米特、MEGASE® 乙酸甲地孕酮 (megestrol acetate)、AROMASIN® 依西美坦 (exemestane)、弗米斯坦 (formestane)、法屈唑 (fadrozole)、

[ S ]

RIVISOR®伏羅唑(vorozole)、FEMARA®來曲唑(letrozole)及ARIMIDEX®安美達錠(anastrozole);及抗雄激素,諸如氟他胺(flutamide)、尼魯米特(nilutamide)、比卡魯胺(bicalutamide)、亮丙瑞林(leuprolide)及戈舍瑞林(goserelin);以及曲沙他濱(troxacitabine)(1,3-二氧戊環核苷胞嘧啶類似物);反義寡核苷酸,尤其抑制異常細胞增生所涉及之信號傳導路徑中的基因表現者,諸如PKC- $\alpha$ 、Raf及H-Ras;核糖核酸酶,諸如VEGF表現抑制劑(例如ANGIOZYME®核糖核酸酶)及HER2表現抑制劑;疫苗,諸如基因療法疫苗,例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗及VAXID®疫苗;PROLEUKIN® rIL-2;LURTOTECAN®拓撲異構酶1抑制劑;ABARELIX®rmRH;長春瑞賓及埃斯培拉黴素(參見美國專利第4,675,187號);及任何上述物質之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

本申請案中所使用之術語「前藥」係指醫藥活性物質之前驅體或衍生物形式(例如小分子),該形式相較母體藥物對患病細胞的細胞毒性小,且能夠酶促活化或轉化成更具活性之母體形式。參見例如Wilman,「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」*Biochemical Society Transactions*, 14, 第375-382頁, 615th Meeting Belfast (1986);及Stella等人,「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,」*Directed Drug Delivery*, Borchardt等人(編),

第247-267頁，Humana Press (1985)。本發明之前藥包括(但不限於)含磷酸酯基之前藥、含硫代磷酸酯基之前藥、含硫酸酯基之前藥、含肽之前藥、D-胺基酸修飾之前藥、糖基化前藥、含 $\beta$ -內醯胺之前藥、含視情況經取代之苯氧基乙醯胺的前藥或含視情況經取代之苯基乙醯胺的前藥、5-氟胞嘧啶及其他5-氟尿苷前藥，其可轉化成更具活性之無細胞毒性藥物。可衍生成用於本發明之前藥形式的細胞毒性藥物之實例包括(但不限於)上文所述之彼等化學治療劑。

「經分離」在用於描述本文中所示之各種多肽時意謂多肽已經鑑別且自表現其之細胞或細胞培養物分離及/或回收。其天然環境之污染組份為通常會干擾多肽之診斷或治療用途之物質，且可包括酶、激素及其他蛋白質或非蛋白質溶質。在實施例中，多肽應純化至：(1)足以藉由使用旋轉杯測序儀獲得N末端或內部胺基酸序列的至少15個殘基之程度；或(2)使用庫馬斯藍(Coomassie blue)或較佳地銀染色劑在非還原或還原條件下藉由SDS-PAGE獲得均質性。由於多肽天然環境之至少一種組份將不存在，所以經分離之多肽包括重組細胞內之原位多肽。然而，通常經分離多肽將由至少一個純化步驟來製備。

「經分離」之編碼多肽之核酸或其他編碼多肽之核酸為經鑑別且自至少一種污染核酸分子分離之核酸分子，該核酸分子在編碼多肽之核酸的天然來源中通常與該污染核酸分子相締合。經分離之編碼多肽之核酸分子不同於自然界

[ S ]

中所見之形式或定位。因此將經分離之編碼多肽之核酸分子與天然細胞中所存在之特定的編碼多肽之核酸分子相區分。然而，經分離之編碼多肽之核酸分子包括含於通常表現多肽之細胞中的編碼多肽之核酸分子，其中例如核酸分子位於不同於天然細胞中之位置之染色體位置。

術語「控制序列」係指在特定宿主生物體內表現可操作地連接之編碼序列所需的DNA序列。適於原核生物之控制序列例如包括啟動子、視情況存在之操縱序列及核糖體結合位點。已知真核細胞利用啟動子、聚腺苷酸化信號及強化子。

當核酸與另一核酸序列功能相關時，其係經「可操作地連接」。舉例而言，若前序列或分泌性前導序列之DNA表現為參與多肽分泌之前體蛋白，則其與該多肽之DNA可操作地連接；若啟動子或強化子影響編碼序列之轉錄，則其與該序列可操作地連接；或若核糖體結合位點經定位以便有助於轉譯，則其與編碼序列可操作地連接。一般而言，「可操作地連接」意謂所連接之DNA序列為相鄰的，且在分泌性前導序列之情況下為相鄰的且處於閱讀相中。然而，強化子不必需為相鄰的。連接係藉由在適宜限制性位點處連接來實現。若此等位點不存在，則根據慣例使用合成寡核苷酸接附子或連接子。

如本文中所定義之「嚴格條件」或「高嚴格條件」可由以下來鑑別：(1)採用低離子強度及高溫進行洗滌，例如在50°C下，0.015 M氯化鈉/0.0015 M檸檬酸鈉/0.1%十二烷基

硫酸鈉；(2)在雜交期間採用諸如甲醯胺之變性劑，例如在42°C下，50%(v/v)含有0.1%牛血清白蛋白之甲醯胺/0.1% Ficoll/0.1%聚乙炔吡咯啉酮/含有750 mM氯化鈉、75 mM檸檬酸鈉之50 mM磷酸鈉緩衝液(pH 6.5)；或(3)在42°C下在採用50%甲醯胺、5×SSC(0.75 M NaCl、0.075 M檸檬酸鈉)、50 mM磷酸鈉(pH 6.8)、0.1%焦磷酸鈉、5×丹哈特氏溶液(Denhardt's solution)、音波處理之鮭魚精DNA(50 µg/ml)、0.1% SDS及10%硫酸聚葡萄糖之溶液中雜交隔夜，其中在42°C下於0.2×SSC(氯化鈉/檸檬酸鈉)中洗滌10分鐘，接著在55°C下由含有EDTA之0.1×SSC組成的洗滌液中高嚴格洗滌10分鐘。

除非說明為其他，否則本文中所述之胺基酸序列為相鄰胺基酸序列。

如本文中所用，術語「免疫黏附素」表示兼有異源蛋白(一種「黏附素」)之結合特異性與免疫球蛋白恆定域之效應功能的抗體樣分子。在結構上，免疫黏附素包含具有所需結合特異性之不為抗體之抗原辨識及結合位點的(亦即為「異源」)胺基酸序列與免疫球蛋白恆定域序列之融合物。免疫黏附素分子之黏附部分通常為至少包含受體或配位體(諸如VEGFR或纖維結合蛋白配位體)之結合位點的相鄰胺基酸序列。免疫黏附素中之免疫球蛋白恆定域序列可獲自任何免疫球蛋白，諸如IgG-1、IgG-2、IgG-3或IgG-4次型、IgA(包括IgA-1及IgA-2)、IgE、IgD或IgM。通常包含對特異性結合與免疫球蛋白之Fc部分融合之標靶的序列

[ S ]



進行噬菌體呈現選擇所獲得之序列的肽體可視作本文中之免疫黏附素。

術語「抗體」係以其最廣義使用且特定涵蓋例如單一單株抗體(包括促效劑、拮抗劑及中和抗體)、具有多抗原決定基特異性之抗體組合物、多株抗體、單鏈抗-抗體、及抗體片段(參見下文)，只要其特異性結合天然多肽及/或展現本發明之生物活性或免疫學活性即可。根據一實施例，抗體結合至靶蛋白之寡聚形式(例如三聚形式)。根據另一實施例，抗體特異性結合至蛋白質，該結合可由本發明之單株抗體(例如本發明之寄存抗體等)抑制。片語抗體之「功能性片段或類似物」為具有與所提及抗體相同之定性生物活性的化合物。舉例而言，本發明之抗體之功能性片段或類似物可為可特異性結合至VEGF或 $\alpha 5\beta 1$ 者。在一實施例中，抗體可阻止或實質上降低VEGF誘導細胞增生的能力。

「經分離抗體」為已經鑑別且自其天然環境之組份分離及/或回收的抗體。其天然環境之污染組份為會干擾抗體之診斷或治療用途之物質，且可包括酶、激素及其他蛋白質或非蛋白質溶質。在實施例中，抗體應純化至：(1)如藉由勞立法(Lowry method)所測定，大於95重量%之抗體，且最佳大於99重量%；(2)足以藉由使用旋轉杯測序儀獲得N末端或內部胺基酸序列的至少15個殘基之程度；或(3)使用庫馬斯藍或較佳地銀染色劑在還原或非還原條件下藉由SDS-PAGE獲得均質性。由於抗體之天然環境之至少一種

組份將不存在，所以經分離抗體包括重組細胞內之原位抗體。然而，經分離抗體通常將藉由至少一個純化步驟來製備。

基本4鏈抗體單元為由兩條相同輕(L)鏈與兩條相同重(H)鏈組成的異四聚體糖蛋白(IgM抗體由5個基本異四聚體單元以及稱作J鏈之另一多肽組成，且因此含有10個抗原結合位點，而分泌IgA抗體可聚合以形成包含2-5個基本4鏈單元以及J鏈的多價集合體)。在IgG之情況下，4鏈單元通常為約150,000道爾頓。各L鏈藉由一個共價雙硫鍵連接至H鏈，而視H鏈同型而定兩條H鏈藉由一或多個雙硫鍵彼此連接。各H鏈及L鏈亦具有規則間隔之鏈內雙硫橋。各H鏈在N端具有可變域( $V_H$ )，其後為各 $\alpha$ 鏈及 $\gamma$ 鏈之三個恆定域( $C_H$ )及 $\mu$ 及 $\epsilon$ 同型之四個 $C_H$ 域。各L鏈在N端具有可變域( $V_L$ )，其後為位於其另一端之恆定域( $C_L$ )。 $V_L$ 與 $V_H$ 比對且 $C_L$ 與重鏈之第一恆定域( $C_{H1}$ )比對。咸信特定胺基酸殘基在輕鏈與重鏈可變域之間形成界面。 $V_H$ 與 $V_L$ 之配對共同形成單一抗原結合位點。關於不同種類抗體之結構及特性，參見例如BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY, 第8版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr及Tristram G. Parslow (編), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 第71頁及第6章。

來自任何脊椎動物物種之L鏈可基於其恆定域之胺基酸序列歸於稱作 $\kappa$ 及 $\lambda$ 之兩個明顯不同類型之一。視重鏈恆定域( $C_H$ )之胺基酸序列而定，免疫球蛋白可歸於不同種類或同型。存在五種免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG及

IgM，分別具有稱為 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 及 $\mu$ 之重鏈。基於 $C_H$ 序列及功能之相對較小的差異，將 $\gamma$ 及 $\alpha$ 種類進一步分成子類，例如人類表現以下子類：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2。

術語「可變」係指在抗體中某些可變域區段在序列上極大不同。V域介導抗原結合且界定特定抗體對其特定抗原之特異性。然而，可變性並非均勻分布在可變域之110個胺基酸範圍上。而是V區由15-30個胺基酸之相對不變段(稱作構架區(FR))由長度各為9-12個胺基酸之具有極大可變性之較短區域(稱作「高變區」)隔開而組成。天然重鏈及輕鏈之可變域各包含四個FR(主要採用 $\beta$ 摺疊構型)由三個高變區連接，其形成環連接，且在一些情況下形成 $\beta$ 摺疊結構之一部分。各鏈中之高變區藉由FR緊密近接保持在一起，且與其他鏈之高變區一起促進抗體之抗原結合位點之形成(參見Kabat等人，SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。雖然恆定域並不直接涉及於抗體與抗原之結合中，但其展現各種效應功能，諸如使抗體參與抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。

本文中所使用之術語「高變區」係指負責抗原結合之抗體胺基酸殘基。高變區一般包含來自「互補決定區」或「CDR」之胺基酸殘基(例如 $V_L$ 中大約殘基24-34(L1)、50-56(L2)及89-97(L3)及 $V_H$ 中大約殘基31-35B(H1)、50-

65(H2)及95-102(H3)(在一實施例中，H1為大約31-35)；Kabat等人，同上)及/或來自「高變環」之彼等殘基(例如V<sub>L</sub>中之殘基26-32(L1)、50-52(L2)及91-96(L3)及V<sub>H</sub>中之殘基26-32(H1)、53-55(H2)及96-101(H3)；Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。

在本說明書及申請專利範圍全文中，當提及可變域中之殘基時，一般使用Kabat編號系統(大約輕鏈中之殘基1-107及重鏈中之殘基1-113)(例如Kabat等人，同上(1991))。當提及免疫球蛋白重鏈恆定區中之殘基時，一般使用「EU編號系統」或「EU指數」(例如Kabat等人，同上(1991)中所報導之EU指數，該文獻係以引用的方式明確併入本文中)。除非本文中說明為其他，否則提及抗體可變域中之殘基編號意謂藉由Kabat編號系統之殘基編號。除非本文中說明為其他，否則提及抗體恆定域中之殘基編號意謂藉由EU編號系統之殘基編號。

如本文中所用之術語「單株抗體」係指自實質上均質之抗體群體獲得之抗體，亦即構成該群體之個別抗體除可少量存在之可能天然存在之突變外為相同的。單株抗體具有高特異性，其係針對單一抗原位點。此外，與包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑相比，各單株抗體係針對抗原上之單一決定子。除特異性之外，單株抗體之優勢亦在於其可在不受其他抗體污染之情況下合成。修飾語「單株」不應理解為需要藉由任何特定方法製造抗體。舉例而言，適用於本發明中之單株抗體可藉由

首先由Kohler等人, *Nature*, 256:495 (1975)描述之融合瘤方法來製備, 或可使用重組DNA方法在細菌、真核動物或植物細胞中製得(參見例如美國專利第4,816,567號)。亦可使用Clackson等人, *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks等人, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)中所述之技術或使用下文實例中所述之方法自噬菌體抗體文庫分離「單株抗體」。

本文中之單株抗體包括「嵌合」抗體, 其中重鏈及/或輕鏈之一部分與源自特定物種或屬於特定抗體種類或子類之抗體中的相應序列一致或同源, 而該(等)鏈之其餘部分與源自另一物種或屬於另一抗體種類或子類之抗體中的相應序列一致或同源; 以及此等抗體之片段, 只要其展現出本發明之生物活性即可(參見美國專利第4,816,567號; 及Morrison等人, *PNAS USA*, 81:6851-6855 (1984))。本文中之相關嵌合抗體包括「靈長類動物化」抗體, 其包含源自非人類靈長類動物(例如舊世界猴(Old World Monkey)、猿等)之可變域抗原結合序列, 及人類恆定區序列。

「親和力成熟」抗體為在一或多個CDR中具有一或多種變化之抗體, 相較不具有彼等變化之親本抗體, 彼等變化使得抗體對抗原之親和力改良。較佳親和力成熟抗體將對靶抗原具有奈莫耳或甚至皮莫耳親和力。親和力成熟抗體係由此項技術中已知之程序製備。Marks等人, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)描述藉由VH及VL域改組得到之親和力成熟。CDR及/或構架殘基之隨機突變誘發於下列文獻中描述: Barbas等人, *PNAS USA* 91:3809-3813

(1994) ; Schier 等人, *Gene* 169:147-155 (1995) ; Yelton 等人, *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995) ; Jackson 等人, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995) ; 及 Hawkins 等人, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992) 。

「阻斷型」抗體或「拮抗劑」抗體為抑制或降低所結合抗原之生物活性的抗體。舉例而言，阻斷型或拮抗劑抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體藉由結合 $\alpha 5\beta 1$ 而部分或完全地抑制血管生成。

「促效劑」抗體為增強或增加所結合抗原之生物活性的抗體。舉例而言，促效劑抗體抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體藉由結合 $\alpha 5\beta 1$ 而增強血管生成。

「完整」抗體為包含抗原結合位點以及 $C_L$ 及至少重鏈恆定域 $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$ 及 $C_{H3}$ 之抗體。恆定域可為天然序列恆定域(例如人類天然序列恆定域)或其胺基酸序列變異體。完整抗體較佳具有一或多種效應功能。

「抗體片段」包含完整抗體之一部分，較佳為完整抗體之抗原結合區或可變區。抗體片段之實例包括 Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 及 Fv 片段；雙功能抗體；線抗體(參見美國專利第 5,641,870 號，實例 2；Zapata 等人, *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 [1995])；單鏈抗體分子；及由抗體片段形成之多特異性抗體。

表述「線抗體」一般係指 Zapata 等人, *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062 (1995) 中所述之抗體。簡言之，此等抗體包含一對串聯 Fd 區段(VH-CH1-VH-CH1)，其與互補輕鏈多肽一起形成一對抗原結合區。線抗體可為雙特異性或單特

[S]

異性的。

用木瓜蛋白酶消化抗體產生兩個稱為「Fab」片段之相同抗原結合片段；及一個殘餘「Fc」片段，該名稱反映容易結晶之能力。Fab片段由完整L鏈連同H鏈之可變區域( $V_H$ )及一重鏈之第一恆定域( $C_{H1}$ )組成。各Fab片段對於抗原結合而言為單價的，亦即其具有單一抗原結合位點。用胃蛋白酶處理抗體產生單一大 $F(ab')_2$ 片段，其大致對應於具有二價抗原結合活性之兩個雙硫鍵連接之Fab片段且仍能夠與抗原交聯。Fab'片段不同於Fab片段之處在於其在 $C_{H1}$ 域的羧基端具有包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸之數個額外殘基。Fab'-SH在本文中指代恆定域之半胱胺酸殘基帶有游離硫醇基之Fab'。 $F(ab')_2$ 抗體片段最初係以其間具有鉸鏈半胱胺酸之Fab'片段對形式產生。亦已知抗體片段之其他化學偶合。

Fc片段包含由雙硫鍵固持在一起之兩個H鏈之羧基端部分。抗體之效應功能係由Fc區中之序列決定，該區亦為由某些類型細胞上所發現之Fc受體(FcR)識別之部分。

「變異Fc區」包含由於至少一種如本文中所定義之「胺基酸修飾」而與天然序列Fc區之序列不同的胺基酸序列。較佳地，相較天然序列Fc區或親本多肽之Fc區，變異Fc區具有至少一個胺基酸取代，例如天然序列Fc區或親本多肽之Fc區中約1至約10個胺基酸取代且較佳約1至約5個胺基酸取代。在一實施例中，本文中之變異Fc區將與天然序列Fc區至少約80%同源、至少約85%同源、至少約90%同

源、至少約95%同源或至少約99%同源。根據另一實施例，本文中之變異Fc區將與親本多肽之Fc區至少約80%同源、至少約85%同源、至少約90%同源、至少約95%同源或至少約99%同源。

術語「包含Fc區之多肽」係指諸如抗體或免疫黏附素之包含Fc區之多肽(參見下文定義)。可例如在純化多肽期間或藉由重組工程改造編碼多肽之核酸來移除Fc區之C端離胺酸(根據EU編號系統之殘基447)。因此，包含本發明之具有Fc區之多肽(包括抗體)的組合物可包含移除所有K447殘基之多肽群體、未移除K447殘基之多肽群體或具有有K447殘基及無K447殘基之多肽之混合物的多肽群體。

「Fv」為含有完整抗原識別位點及抗原結合位點的最小抗體片段。此片段由一個重鏈可變區域與一個輕鏈可變區域緊密非共價締合之二聚體組成。自此兩個結構域之摺疊產生6個高變環(H鏈及L鏈各產生3個環)，該等高變環促進胺基酸殘基用於抗原結合且賦予抗體以抗原結合特異性。然而，即使單一可變域(或僅包含三個對抗原具特異性之CDR之半個Fv)亦具有識別及結合抗原之能力，但其親和力比完整結合位點低。

「單鏈Fv」(亦縮寫為「sFv」或「scFv」)為包含連接成單一多肽鏈之V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>抗體域的抗體片段。sFv多肽較佳在V<sub>H</sub>與V<sub>L</sub>域之間進一步包含多肽連接子，其使得sFv能夠形成供抗原結合之所需結構。關於sFv之評述，參見

Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, [S.1]



第 113 卷, Rosenberg 及 Moore 編, Springer-Verlag, New York, 第 269-315 頁 (1994); Borrebaeck 1995, 同下。

術語「雙功能抗體」係指藉由在  $V_H$  域與  $V_L$  域之間使用短連接子(約 5-10 個殘基)建構 sFv 片段(參見先前段落)以便達成 V 域之鏈間而非鏈內配對從而產生二價片段(亦即具有兩個抗原結合位點之片段)而製得的小抗體片段。雙特異性雙功能抗體為兩個「交叉」sFv 片段之異二聚體, 其中兩個抗體之  $V_H$  及  $V_L$  域存在於不同多肽鏈上。雙功能抗體於例如 EP 404,097; WO 93/11161; 及 Hollinger 等人, *PNAS USA*, 90:6444-6448 (1993) 中更詳盡地描述。

「人類化」抗體為非人類(例如齧齒動物)抗體形式, 其為含有源自非人類抗體之最小序列之嵌合抗體。在極大程度上, 人類化抗體為來自接受者之高變區之殘基經具有所需抗體特異性、親和力及能力之來自諸如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物之非人類物種(供體抗體)的高變區之殘基置換的人類免疫球蛋白(接受者抗體)。在一些情況下, 人類免疫球蛋白之構架區(FR)殘基經相應之非人類殘基置換。此外, 人類化抗體可包含接受者抗體或供體抗體中未見之殘基。進行此等修飾以進一步改善抗體效能。一般而言, 人類化抗體將包含實質上所有之至少一個且通常兩個可變域, 其中所有或實質上所有高變環對應於非人類免疫球蛋白之高變環, 且所有或實質上所有 FR 為人類免疫球蛋白序列之 FR。人類化抗體視情況亦將包含免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分, 通常人類免疫球蛋白恆定區之

至少一部分。關於其他細節，參見 Jones 等人，*Nature* 321:522-525 (1986)；Riechmann 等人，*Nature* 332:323-329 (1988)；及 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。

「物種依賴性抗體」為對來自第一哺乳動物物種之抗原的結合親和力比其對來自第二哺乳動物物種之彼抗原同源物的結合親和力強的抗體。通常，物種依賴性抗體「特異性結合」至人類抗原(亦即，結合親和力(Kd)值不超過約  $1 \times 10^{-7}$  M、不超過約  $1 \times 10^{-8}$  M或不超過約  $1 \times 10^{-9}$  M)，但對來自第二非人類哺乳動物物種之該抗原同源物的結合親和力比其對人類抗原之結合親和力弱至少約 50 倍或至少約 500 倍或至少約 1000 倍。物種依賴性抗體可為如上定義之各種類型抗體中之任一種，但較佳為人類化或人類抗體。

在此等實施例中，如由螢光活化細胞分選(FACS)分析或放射免疫沈澱(RIA)所測定，多肽、抗體、拮抗劑或組合物與「非靶」蛋白之結合程度將比多肽、抗體、拮抗劑或組合物與其特定靶蛋白之結合程度小約 10%。關於多肽、抗體、拮抗劑或組合物與靶分子之結合，術語「特異性結合」或「特異性結合至」特定多肽或特定多肽標靶上之抗原決定基或對特定多肽或特定多肽標靶上之抗原決定基「具特異性」意謂結合與非特異性相互作用具有可量測程度之差異。可例如藉由相較於對照分子(其一般為不具有結合活性之類似結構之分子)之結合測定分子之結合來量測特異性結合。舉例而言，可藉由與類似於標靶之對照分

[ S ]

子(例如過量之未經標記標靶)競爭來測定特異性結合。在此情況下，若經標記標靶與探針之結合由過量未經標記標靶競爭性抑制，則指示特異性結合。如本文中所示之術語「特異性結合」或「特異性結合至」特定多肽或特定多肽標靶上之抗原決定基或對特定多肽或特定多肽標靶上之抗原決定基「具特異性」可由例如分子對標靶之 $K_d$ 為至少約 $10^{-4}$  M、至少約 $10^{-5}$  M、至少約 $10^{-6}$  M、至少約 $10^{-7}$  M、至少約 $10^{-8}$  M、至少約 $10^{-9}$  M、或者至少約 $10^{-10}$  M、至少約 $10^{-11}$  M、至少約 $10^{-12}$  M或約 $10^{-12}$  M以上來展現。在一實施例中，術語「特異性結合」係指分子結合至特定多肽或特定多肽上之抗原決定基而實質上不結合至任何其他多肽或多肽抗原決定基的結合。

抗體「效應功能」係指可歸因於抗體之Fc區(天然序列Fc區或胺基酸序列變異Fc區)之彼等生物活性，且其隨抗體同型而變化。抗體效應功能之實例包括：C1q結合及補體依賴性細胞毒性；Fc受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；細胞表面受體之下調；及B細胞活化。「天然序列Fc區」包含與自然界中發現之Fc區之胺基酸序列一致的胺基酸序列。Fc序列之實例於例如(但不限於)Kabat等人，同上(1991)中描述。

關於本文中所鑑別之多肽及抗體序列之「胺基酸序列一致性百分比(%)」或「同源性」經定義為在將任何保守性取代視作序列一致性之一部分對序列進行比對之後，候選序列中與經比較多肽中之胺基酸殘基一致的胺基酸殘基百



分比。為測定胺基酸序列一致性百分比而進行之比對可以此項技術中之多種方式達成，例如使用可公開獲得之電腦軟體，諸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 軟體。熟習此項技術者可確定用於量測比對之適當參數，包括在所比較序列之全長上達成最大比對所需的任何演算法。然而，為達成本文之目的，胺基酸序列一致性百分比係使用序列比較電腦程式 ALIGN-2 產生。ALIGN-2 序列比較電腦程式係由 Genentech, Inc. 編寫且原始碼已與使用者文件一起歸檔於美國版權辦公室 (U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559)，在其中其係以美國版權寄存號第 TXU510087 號寄存。ALIGN-2 程式可通過 Genentech, Inc. (South San Francisco, California) 公開獲得。ALIGN-2 程式應經編譯以用於 UNIX 操作系統，較佳數位 UNIX V4.0D。所有序列比較參數由 ALIGN-2 程式設定且不改變。

術語「Fc 受體」或「FcR」係用於描述與抗體之 Fc 區結合的受體。在一實施例中，本發明之 FcR 為結合 IgG 抗體之 FcR ( $\gamma$  受體) 且包括 Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII 及 Fc $\gamma$ RIII 子類之受體，包括此等受體之對偶基因變異體及替代性剪接形式。Fc $\gamma$ RII 受體包括 Fc $\gamma$ RIIA (「活化受體」) 及 Fc $\gamma$ RIIB (「抑制受體」)，其具有主要差異在其細胞質域之相似胺基酸序列。活化受體 Fc $\gamma$ RIIA 之細胞質域中含有基於免疫受體酪胺酸之活化基元 (ITAM)。抑制受體 Fc $\gamma$ RIIB 之細胞質域中含有基於免疫受體酪胺酸之抑制基元 (ITIM) (參見評述 M.

[ S ]

in Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997))。該術語包括異型，諸如 Fc $\gamma$ RIIIA 異型：Fc $\gamma$ RIIIA-Phe158、Fc $\gamma$ RIIIA-Val158、Fc $\gamma$ RIIA-R131及/或 Fc $\gamma$ RIIA-H131。FcR 於 Ravetch 及 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)；Capel 等人, *Immunomethods* 4:25-34 (1994)；及 de Haas 等人, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995) 中評述。本文中之術語「FcR」涵蓋其他 FcR，包括將來鑑別之彼等 FcR。該術語亦包括新生兒受體 FcRn，其負責將母體 IgG 轉移至胎兒 (Guyer 等人, *J. Immunol.* 117:587 (1976) 及 Kim 等人, *J. Immunol.* 24:249 (1994))。

術語「FcRn」係指新生兒 Fc 受體 (FcRn)。FcRn 在結構上與主要組織相容性複合物 (MHC) 類似且由非共價結合至  $\beta$ 2-微球蛋白之  $\alpha$  鏈組成。新生兒 Fc 受體 FcRn 之多種功能於 Ghetie 及 Ward (2000) *Annu. Rev. Immunol.* 18, 739-766 中評述。FcRn 在免疫球蛋白 IgG 自母體至幼體之被動傳遞及血清 IgG 含量之調控中發揮作用。FcRn 可充當救助受體，在細胞內及橫跨細胞結合且轉運呈完整形式之胞飲 IgG，且自預設降解路徑將其援救。

WO 00/42072 (Presta) 及 Shields 等人, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001) 描述與 FcR 之結合改良或減少的抗體變異體。彼等公開案之內容特定地以引用的方式併入本文中。

人類 IgG Fc 區之「CH1 域」(亦稱作「H1」域之「C1」) 通常自約胺基酸 118 延伸至約胺基酸 215 (EU 編號系統)。

「鉸鏈區」一般定義為自人類 IgG1 之 Glu216 延伸至

Pro230(Burton, *Molec. Immunol.*22:161-206 (1985))。藉由將形成重鏈間S-S鍵之第一個及最後的半胱胺酸殘基置於相同位置可使其他IgG同型之鉸鏈區與IgG1序列比對。

Fc區之「下部鉸鏈區」通常經定義為與鉸鏈區之C端緊鄰的殘基段，亦即Fc區之殘基233至239。在先前報導中，FcR結合一般係歸因於IgG Fc區之下部鉸鏈區中的胺基酸殘基。

人類IgG Fc區之「CH2域」(亦稱作「H2」域之「C2」)通常自約胺基酸231延伸至約胺基酸340。CH2域之獨特之處在於其並不與另一結構域緊密配對。而是兩個N連接分支鏈醣鏈插入完整天然IgG分子之兩個CH2域之間。已推測醣類可提供域-域配對之替代且有助於穩定CH2域。Burton, *Molec. Immunol.*22:161-206 (1985)。

「CH3域」(亦稱作「C2」或「H3」域)包含Fc區中CH2域C端的殘基段(亦即約胺基酸殘基341至抗體序列之C端，通常在IgG之胺基酸殘基446或447處)。

「功能性Fc區」具有天然序列Fc區之「效應功能」。例示性「效應功能」包括C1q結合；補體依賴性細胞毒性；Fc受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；細胞表面受體(例如B細胞受體；BCR)之下調等。此等效應功能一般需要Fc區與結合域(例如抗體可變域)組合且可例如使用如本文中所揭示之各種檢定來評定。

「C1q」為包括對免疫球蛋白之Fc區之結合位點的多

[S]

肽。C1q與兩種絲胺酸蛋白酶C1r及C1s一起形成複合物C1，其為補體依賴性細胞毒性(CDC)路徑之第一組份。人類C1q可購自例如Quidel, San Diego, CA。

術語「結合域」係指結合至另一分子之多肽區域。在FcR之情況下，結合域可包含負責結合Fc區之其多肽鏈(例如其 $\alpha$ 鏈)之一部分。一種適用結合域為FcR  $\alpha$ 鏈之細胞外域。

具有擁有「經改變」之FcR結合親和力或ADCC活性之變異IgG Fc的抗體或肽體為相較親本多肽或包含天然序列Fc區之多肽具有增強或減低之FcR結合活性(例如Fc $\gamma$ R或FcRn)及/或ADCC活性的抗體或肽體。「展現增加結合」至FcR之變異Fc結合至少一種FcR之親和力高於(例如表觀Kd或IC50值較低)親本多肽或天然序列IgG Fc。根據一些實施例，相較親本多肽，結合提高約3倍，較佳約5倍、10倍、25倍、50倍、60倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、400倍、450倍或500倍，或結合提高約25%至1000%。「展現減少結合」至FcR之多肽變異體結合至少一種FcR之親和力低於(例如表觀Kd或IC50值較高)親本多肽。相較親本多肽，結合減少可為約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%或60%以上之結合減少。

「抗體依賴性細胞介導之細胞毒性」或「ADCC」係指一種細胞毒性形式，其中分泌Ig與存在於某些細胞毒性細胞(例如自然殺手(NK)細胞、嗜中性白血球及巨噬細胞)上之Fc受體(FcR)結合使此等細胞毒性效應細胞能夠特異性

結合至帶有抗原之靶細胞且隨後以細胞毒素殺死靶細胞。抗體「配備」細胞毒性細胞且絕對為此殺傷所需。用於介導ADCC之初級細胞NK細胞僅表現FcγRIII，而單核細胞表現FcγRI、FcγRII及FcγRIII。FcR在造血細胞上之表現於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)之第464頁上的表3中概述。為評定相關分子之ADCC活性，可進行活體外ADCC檢定，諸如美國專利第5,500,362號或第5,821,337號或下文實例中所述之檢定。適用於此等檢定之效應細胞包括周邊血液單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。或者或另外，可活體內，例如在諸如 Clynes 等人, *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)中所揭示之動物模型中評定相關分子之ADCC活性。

當檢定中具有變異Fc區之多肽與具有野生型Fc區之多肽(或親本多肽)之量基本上相同時，相較具有野生型IgG Fc之多肽或親本多肽在人類效應細胞存在下「展現增加之ADCC」或更有效介導抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)之包含變異Fc區的多肽為活體外或活體內實質上更有效介導ADCC之多肽。一般而言，此等變異體將使用如本文中所揭示之活體外ADCC檢定來鑑別，但涵蓋例如在動物模型等中測定ADCC活性之其他檢定或方法。在一實施例中，較佳變異體在介導ADCC方面比野生型Fc(或親本多肽)有效約5倍至約100倍，例如約25倍至約50倍。

「補體依賴性細胞毒性」或「CDC」係指在補體存在下溶解靶細胞。經典補體活化路徑係藉由補體系統之第一組

[ S ]



份(C1q)結合至與其同源抗原結合之(適當子類之)抗體而起始。為評定補體活化，可進行CDC檢定，例如如Gazzano-Santoro等人, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)中所述。

具有已變化之Fc區胺基酸序列及增加或降低之C1q結合能力的多肽變異體於美國專利第6,194,551號及WO 99/51642中描述。彼等專利公開案之內容係特定地以引用的方式併入本文中。亦參見Idusogie等人, *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)。

「人類效應細胞」為表現一或多個FcR且執行效應功能之白血球。根據一實施例，該等細胞至少表現FcγRIII且執行ADCC效應功能。介導ADCC之人類白血球之實例包括周邊血液單核細胞(PBMC)、自然殺手(NK)細胞、單核細胞、細胞毒性T細胞及嗜中性白血球；其中PBMC及NK細胞較佳。效應細胞可自其天然來源分離，例如自如本文中所述之血液或PBMC分離。

量測與FcRn之結合之方法係已知(參見例如Ghetie 1997, Hinton 2004)。人類FcRn高親和力結合多肽與人類FcRn之活體內結合及血清半衰期可例如在表現人類FcRn之轉殖基因小鼠或轉染人類細胞株中檢定，或在經投與Fc變異多肽之靈長類動物中檢定。在一實施例中，特定言之，具有變異IgG Fc之本發明抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體相較具有野生型IgG Fc之多肽展現對人類FcRn之結合親和力增加至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少50倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少100倍、至少125倍、至少150倍。在一特定實施例

中，對人類FcRn之結合親和力增加約170倍。

在一實施例中，關於對FcRn之結合親和力，多肽之EC50或表觀Kd(在pH 6.0下)小於1  $\mu$ M，更佳小於或等於100 nM，更佳小於或等於10 nM。在一實施例中，關於對Fc $\gamma$ RIII(F158；亦即低親和力同型)增加之結合親和力，EC50或表觀Kd小於或等於10 nM，且對於Fc $\gamma$ RIII(V158；高親和力同型)，EC50或表觀Kd小於或等於3 nM。根據另一實施例，若測試抗體與對照抗體結合曲線之中點處吸光度值之比率(例如  $A_{450 \text{ nm}}(\text{抗體})/A_{450 \text{ nm}}(\text{對照抗體})$ )小於或等於40%，則相對於對照抗體(例如Herceptin®抗體)，抗體與Fc受體結合之降低可視作相對於對照抗體顯著。根據另一實施例，若測試抗體與對照抗體結合曲線之中點處吸光度值之比率(例如  $A_{450 \text{ nm}}(\text{抗體})/A_{450 \text{ nm}}(\text{對照抗體})$ )大於或等於125%，則相對於對照抗體(例如Herceptin®抗體)，抗體與Fc受體結合之增加可視作相對於對照抗體顯著。

「親本多肽」或「親本抗體」為包含滿足以下之胺基酸序列的多肽或抗體：自該胺基酸序列產生變異多肽或抗體且針對該胺基酸序列對變異多肽或抗體進行比較。通常親本多肽或親本抗體缺乏一或多個本文中所揭示之Fc區修飾且相較如本文中所揭示之多肽變異體效應功能不同。親本多肽可包含天然序列Fc區或具有預先存在之胺基酸序列修飾(諸如添加、缺失及/或取代)的Fc區。

本發明抗體可源自噬菌體呈現。如本文中所用，「文庫」係指複數個抗體或抗體片段序列，或編碼此等序列之

[ S ]

核酸，該等序列在根據本發明方法引入此等序列中之變異胺基酸組合方面不同。

「噬菌體呈現」為使變異多肽以與鞘蛋白之至少一部分之融合蛋白形式呈現於噬菌體(例如絲狀噬菌體)粒子表面上的技術。噬菌體呈現之效用在於可自隨機化蛋白質變異體之龐大文庫中快速且有效地分選彼等以高親和力結合至靶抗原之序列。已使用肽及蛋白質文庫於噬菌體上之呈現來自數百萬多肽中篩選具有特異性結合性質之多肽。多價噬菌體呈現方法已用於經由與絲狀噬菌體之基因III或基因VIII融合來呈現小隨機肽及小蛋白質。Wells及Lowman, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3:355-362 (1992), 及其中所引用之參考文獻。在單價噬菌體呈現中，使蛋白質或肽文庫融合至基因III或其一部分，且在野生型基因III蛋白質存在下以低程度表現以使得噬菌體粒子呈現融合蛋白之一個複本或不呈現。相對於多價噬菌體而言，親和力作用降低，因此分選係基於固有配位體親和力，且使用簡化DNA操作之噬菌粒載體。Lowman及Wells, *Methods: A companion to Methods in Enzymology*, 3:205-0216 (1991)。

「噬菌粒」為具有例如ColE1之細菌複製起點及噬菌體之基因間區複本的質體載體。噬菌粒可用於任何已知之噬菌體，包括絲狀噬菌體及人字形噬菌體。質體一般亦將含有針對抗生素抗性之可選標誌。選殖至此等載體中之DNA區段可繁殖為質體。當含有此等載體之細胞具有產生噬菌體粒子所需之所有基因時，質體之複製模式變為滾環式複

製(rolling circle replication)以產生質體DNA中之一股之複本且封裝噬菌體粒子。噬菌粒可形成感染性或非感染性噬菌體粒子。此術語包括含有噬菌體鞘蛋白基因或其片段連接至異源多肽基因形成基因融合體以使得該異源多肽呈現於噬菌體粒子表面上之噬菌粒。

術語「噬菌體載體」意謂含有異源基因且能夠複製之噬菌體之雙股複製形式。噬菌體載體具有允許噬菌體複製及噬菌體粒子形成之噬菌體複製起點。噬菌體較佳為絲狀噬菌體，諸如M13、f1、fd、Pf3噬菌體或其衍生物；或人字形噬菌體，諸如 $\lambda$ 、21、phi80、phi81、82、424、434等或其衍生物。

多肽(諸如肽體、免疫黏附素、抗體及短肽)之共價修飾包括在本發明之範疇內。共價修飾之一種類型包括使多肽之靶向胺基酸殘基與有機衍生劑反應，該有機衍生劑能夠與多肽之所選側鏈或N端或C端殘基反應。以雙功能劑衍生適用於例如將多肽與用於純化抗體方法中之水不溶性支撐基質或表面交聯，且反之亦然。常用交聯劑包括例如1,1-雙(重氮乙醯基)-2-苯基乙烷、戊二醛、N-羥基-丁二醯亞胺酯(例如與4-疊氮基水楊酸形成之酯)、同質雙官能醯亞胺酯(包括二丁二醯亞胺基酯，諸如3,3'-二硫代雙(丁二醯亞胺基丙酸酯))、雙官能順丁烯二醯亞胺(諸如雙-N-順丁烯二醯亞胺基-1,8-辛烷)及諸如甲基-3-[(對疊氮基苯基)二硫基]丙醯亞胺酯之試劑。

其他修飾包括麩醯胺醯基及天冬醯胺醯基殘基分別脫醯

[ S ]

胺化成相應麩胺醯基及天冬胺醯基殘基；脯胺酸及離胺酸之羥化；絲胺醯基或蘇胺醯基殘基之羥基的磷酸化；離胺酸、精胺酸及組胺酸側鏈之 $\alpha$ -胺基的甲基化 [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 第79-86頁(1983)]；N端胺之乙醯化；及任何C端羧基之醯胺化。

其他修飾包括毒素與拮抗劑結合，諸如美登素及類美登素、卡奇黴素及其他細胞毒性劑。

多肽之共價修飾之另一類型包含以美國專利第4,640,835號、第4,496,689號、第4,301,144號、第4,670,417號、第4,791,192號或第4,179,337號中所述之方式使多肽連接至多種非蛋白質聚合物(例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚環氧烷)之一。

若有利，亦可以形成包含與另一異源多肽或胺基酸序列(例如免疫黏附素或肽體)融合之多肽之嵌合分子的方式來修飾本發明多肽。

在一實施例中，此嵌合分子包含多肽與蛋白質轉導域之融合體，其使用例如人類免疫缺乏病毒TAT蛋白之蛋白質轉導域靶向多肽以傳遞至多個組織且更特定言之穿過腦血障壁(Schwarze等人, 1999, *Science* 285: 1569-72)。

在另一實施例中，此嵌合分子包含多肽與標籤多肽的融合體，該標籤多肽提供抗標籤抗體可選擇性結合之抗原決定基。一般將抗原決定基標籤置於多肽之胺基端或羧基端。可使用針對標籤多肽之抗體偵測多肽之此等抗原決定

基標記物形式之存在。又，提供抗原決定基標籤使得多肽能夠輕易地使用抗標籤抗體或另一類型之結合至抗原決定基標籤的親和力基質藉由親和力純化法純化。此項技術中已知各種標籤多肽及其各別抗體。實例包括聚-組胺酸 (poly-His) 或聚-組胺酸-甘胺酸 (poly-His-gly) 標籤；flu HA 標籤多肽及其抗體 12CA5 [Field 等人, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]；c-myc 標籤及其 8F9、3C7、6E10、G4、B7 及 9E10 抗體 [Evan 等人, *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]；及單純性疱疹病毒醣蛋白 D(gD) 標籤及其抗體 [Paborsky 等人, *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)]。其他標籤多肽包括 Flag-肽 [Hopp 等人, *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)]；KT3 抗原決定基肽 [Martin 等人, *Science*, 255:192-194 (1992)]； $\alpha$ -微管蛋白抗原決定基肽 [Skinner 等人, *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]；及 T7 基因 10 蛋白肽標籤 [Lutz-Freyermuth 等人, *PNAS USA*, 87:6393-6397 (1990)]。

在一替代實施例中，嵌合分子可包含多肽與免疫球蛋白或免疫球蛋白之特定區域之融合體。對於嵌合分子(例如「免疫黏附素」)之二價形式而言，此融合體可為與 IgG 分子之 Fc 區之融合體。本發明之 Ig 融合體包括包含大約或僅人類殘基 94-243、殘基 33-53 或殘基 33-52 替代 Ig 分子內之至少一個可變區的多肽。在一特定實施例中，免疫球蛋白融合體包括 IgG1 分子之鉸鏈、CH2 及 CH3 區，或鉸鏈、CH1、CH2 及 CH3 區。關於免疫球蛋白融合體之製備，亦

[ 5 ]

參見美國專利第5,428,130號。

本發明提供抑制或預防復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長之方法及組合物。在各種實施例中，癌症為復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長，其中癌細胞數目未顯著減少或已增多，或腫瘤尺寸未顯著減小或已增大，或癌細胞尺寸未能有任何進一步減小或癌細胞數目未能有任何進一步減少。可藉由此項技術中已知用於檢定對癌細胞治療之有效性的任何方法活體內或活體外確定癌細胞是否為復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長。對抗-VEGF治療有抗性的腫瘤為復發性腫瘤生長之實例。

如本文中所揭示之多肽、抗體、拮抗劑或組合物之「有效量」為足以實施特定所述目的之量。「有效量」可根據經驗及藉由關於所述目的之已知方法確定。

術語「治療有效量」係指本發明之抗體、多肽或拮抗劑可有效「治療」哺乳動物(aka患者)之疾病或病症的量。在癌症之情況下，治療有效量之藥物可減少癌細胞之數目；減小腫瘤尺寸或重量；抑制(亦即，在一定程度上減緩且較佳終止)癌細胞浸潤至周邊器官中；抑制(亦即，在一定程度上減緩且較佳終止)腫瘤轉移；在一定程度上抑制腫瘤生長；及/或在一定程度上緩解與癌症相關之一或多種症狀。對於藥物可防止現有癌細胞生長及/或殺死現有癌細胞之程度而言，藥物可為細胞生長抑制劑及/或細胞毒性劑。在一實施例中，治療有效量為生長抑制量。在另一實施例中，治療有效量為延長患者存活期之量。在另一實

施例中，治療有效量為改善患者之無進展存活之量。

在創傷癒合之情況下，術語「有效量」或「治療有效量」係指可有效加速或改善個體創傷癒合之藥物量。治療劑量為對患者展現治療作用之劑量，且低於治療劑量(sub-therapeutic dose)為對所治療患者不展現治療作用之劑量。

「慢性創傷」係指不癒合之創傷。參見例如 Lazarus 等人, Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing, Arch. Dermatol. 130:489-93 (1994)。慢性創傷包括(但不限於)例如動脈潰瘍、糖尿病性潰瘍、壓力性潰瘍、靜脈潰瘍等。急性創傷可發展成慢性創傷。急性創傷包括(但不限於)由例如熱損傷、外傷、外科手術、大範圍皮膚癌切除、深度真菌及細菌感染、血管炎、硬皮病、天疱瘡、中毒性表皮壞死溶解等引起之創傷。參見例如 Buford, Wound Healing and Pressure Sores, HealingWell.com, 出版於 2001 年 10 月 24 日。「普通創傷」係指經歷普通創傷癒合修復之創傷。

本發明多肽、抗體、拮抗劑或組合物之「生長抑制量」為能夠活體外或活體內抑制細胞、尤其腫瘤(例如癌細胞)生長之量。可根據經驗及藉由已知方法或藉由本文中所提供之實例來確定為抑制贅生性細胞生長之本發明多肽、抗體、拮抗劑或組合物的「生長抑制量」。

本發明多肽、抗體、拮抗劑或組合物之「細胞毒性量」為能夠活體外或活體內引起細胞、尤其腫瘤(例如癌細胞)破壞之量。可根據經驗及藉由此項技術中已知之方法來確

[ S ]



定為抑制贅生性細胞生長之本發明多肽、抗體、拮抗劑或組合物的「細胞毒性量」。

本文中之「自體免疫疾病」為由個體自身組織產生且針對個體自身組織之疾病或病症，或其共分離系 (co-segregate) 或表現形式或由其產生之病狀。自體免疫疾病或病症之實例包括 (但不限於)：關節炎 (類風濕性關節炎，諸如急性關節炎、慢性類風濕性關節炎、痛風性關節炎、急性痛風性關節炎、慢性發炎性關節炎、退化性關節炎、感染性關節炎、萊姆關節炎 (Lyme arthritis)、增生性關節炎、牛皮癬性關節炎、椎骨關節炎、及青少年發作型類風濕性關節炎、骨關節炎、慢性漸進性關節炎、變形性關節炎、慢性原發性多發性關節炎、反應性關節炎、及僵直性脊椎炎)、發炎性高增生性皮膚疾病、牛皮癬 (諸如斑塊牛皮癬、點狀牛皮癬、膿皰型牛皮癬、及指甲牛皮癬)、皮炎 (包括接觸性皮炎、慢性接觸性皮炎、過敏性皮炎、過敏性接觸性皮炎、疱疹樣皮炎及異位性皮炎)、x 性聯高 IgM 症候群、風疹 (諸如慢性特發性風疹，包括慢性自體免疫風疹)、多發性肌炎/皮肌炎、青少年皮肌炎、中毒性表皮壞死溶解、硬皮病 (包括全身性硬皮病)、硬化症 (諸如全身性硬化症、多發性硬化症 (MS) (諸如脊椎-眼 MS、原發性進行性 MS 及復發緩解型 MS)、進行性全身性硬化症、動脈粥樣硬化、動脈硬化、播散性硬化症及共濟失調性硬化症)、發炎性腸病 (IBD) (例如克隆氏病、結腸炎 (諸如潰瘍性結腸炎 (ulcerative colitis/colitis ulcerosa)、微小性結腸

炎、膠原性結腸炎、息肉狀結腸炎、壞死性小腸結腸炎及透壁性結腸炎)、及自體免疫發炎性腸病)、壞疽性膿皮病、結節性紅斑、原發性硬化性膽管炎、上鞏膜炎、呼吸窘迫症候群(包括成人或急性呼吸窘迫症候群(ARDS))、腦膜炎、葡萄膜全部或部分發炎、虹膜炎、脈絡膜炎、自體免疫血液科病症、類風濕性脊椎炎、突發性聽力損失、IgE介導之疾病(諸如全身性過敏反應及過敏性及異位性鼻炎)、腦炎(諸如拉斯穆森氏腦炎(Rasmussen's encephalitis)及大腦邊緣及/或腦幹腦炎)、葡萄膜炎(諸如前葡萄膜炎、急性前葡萄膜炎、肉芽腫性葡萄膜炎、非肉芽腫性葡萄膜炎、晶體狀抗原性葡萄膜炎、後葡萄膜炎或自體免疫葡萄膜炎)、伴有及不伴有腎病症候群之絲球體腎炎(GN)(諸如慢性或急性絲球體腎炎, 諸如原發性GN、免疫介導性GN、膜性GN(膜性腎病)、特發性膜性GN、膜性增生性GN(MPGN)(包括I型及II型)及快速進行性GN)、過敏性病狀、過敏反應、濕疹(包括過敏性或異位性濕疹)、哮喘(諸如支氣管哮喘及自體免疫哮喘)、涉及T細胞浸潤及慢性發炎反應之病狀、慢性肺部發炎疾病、自體免疫心肌炎、白血球黏附缺乏、全身性紅斑狼瘡(SLE)(諸如皮膚SLE)、亞急性皮膚紅斑狼瘡、新生兒狼瘡症候群(NLE)、播散性紅斑狼瘡、狼瘡(包括腎炎性、大腦炎性、嬰兒性、非腎臟性、圓盤狀、禿頭症性)、青少年發作型(I型)糖尿病(包括嬰兒胰島素依賴性糖尿病(IDDM))、成人發作型糖尿病(II型糖尿病)、自體免疫糖尿病、特發性尿崩症、與由細胞

[ S ]

激素及T淋巴細胞介導之急性及遲發過敏性相關的免疫反應、結核病、類肉瘤病、肉芽腫病(包括淋巴瘤樣肉芽腫病、韋格納氏肉芽腫病)、顆粒性白血球缺乏症、血管病(包括血管炎(包括大血管血管炎(包括風濕性多肌痛及巨細胞(高安氏(Takayasu's))動脈炎)、中等血管血管炎(包括川崎氏病(Kawasaki's disease)及結節性多動脈炎)、顯微下多動脈炎、CNS血管炎、壞死性血管炎、皮膚血管炎或過敏性血管炎、全身性壞死性血管炎及ANCA相關血管炎, 諸如徹奇-斯全司(Churg-Strauss)血管炎或症候群(CSS))、顛動脈炎、再生障礙性貧血、自體免疫再生障礙性貧血、庫氏試驗陽性貧血(Coombs positive anemia)、先天性純紅血球再生障礙性貧血(Diamond Blackfan anemia)、溶血性貧血或免疫溶血性貧血(包括自體免疫溶血性貧血(AIHA)、惡性貧血、阿狄森氏病(Addison's disease)、純紅血球貧血或發育不全(PRCA))、因子VIII缺乏、A型血友病、自體免疫嗜中性白血球減少症、全血球減少症、白血球減少症、涉及白血球滲出之疾病、CNS發炎性病症、多器官損傷症候群(諸如因敗血病、外傷或出血繼發之多器官損傷症候群)、抗原-抗體複合物介導之疾病、抗腎小球基底膜疾病、抗磷脂抗體症候群、過敏性神經炎、白塞氏病(Bechet's/Behcet's disease)、卡索曼氏症候群(Castleman's syndrome)、古巴士德氏症候群(Goodpasture's syndrome)、瑞諾氏症候群(Reynaud's syndrome)、休格連氏症候群、史蒂芬-瓊森症候群(Stevens-Johnson syndrome)、類天疱瘡

(諸如大皰性類天疱瘡及皮膚類天疱瘡)、天疱瘡(包括尋常天疱瘡、落葉型天疱瘡、黏膜類天疱瘡及紅斑性天疱瘡)、自體免疫多內分泌病、萊特氏(Reiter's)疾病或症候群、免疫複合物腎炎、抗體介導性腎炎、慢性神經病(諸如IgM多發性神經病或IgM介導性神經病)、血小板減少症(例如由心肌梗塞患者發展而來)(包括血栓性血小板減少性紫癍(TTP)及自體免疫或免疫介導性血小板減少症, 諸如特發性血小板減少性紫癍(ITP)(包括慢性或急性ITP))、睪丸及卵巢之自體免疫疾病(包括自體免疫睪丸炎及卵巢炎)、原發性甲狀腺功能低下、副甲狀腺低能症、自體免疫內分泌疾病(包括甲狀腺炎, 諸如自體免疫甲狀腺炎、橋本氏病(Hashimoto's disease)、慢性甲狀腺炎(橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis))、或亞急性甲狀腺炎)、自體免疫甲狀腺疾病、特發性甲狀腺功能低下、格雷夫氏病(Grave's disease)、多腺體症候群(諸如自體免疫多腺體症候群(或多腺體內分泌病症候群))、副腫瘤症候群(包括神經性副腫瘤症候群, 諸如蘭伯特-伊頓肌無力症候群(Lambert-Eaton myasthenic syndrome)或伊頓-蘭伯特症候群(Eaton-Lambert syndrome))、僵人症候群、腦脊髓炎(諸如過敏性腦脊髓炎及實驗性過敏性腦脊髓炎(EAE))、重症肌無力、小腦退化、神經性肌強直、眼陣攣或眼陣攣肌陣攣症候群(OMS), 及感覺神經病、席漢氏症候群(Sheehan's syndrome)、自體免疫肝炎、慢性肝炎、類狼瘡肝炎、巨細胞肝炎、慢性活動性肝炎或自體免疫慢性活動性肝炎、

[ S ]

淋巴間質肺炎、阻塞性細支氣管炎(非移植)對NSIP、格林-巴利症候群(Guillain-Barré syndrome)、伯格氏病(Berger's disease)(IgA腎病)、特發性IgA腎病、線性IgA皮膚病、原發性膽汁性肝硬化、肺硬變、自體免疫腸病症候群、乳糜瀉、腹腔疾病、口炎性腹瀉(麩質腸病)、難治性口炎性腹瀉、特發性口炎性腹瀉、冷球蛋白血症、肌萎縮性側索硬化(ALS；路·蓋里格氏病(Lou Gehrig's disease))、冠狀動脈疾病、自體免疫內耳疾病(AIED)、或自體免疫聽力損失、眼陣攣肌陣攣症候群(OMS)、多軟骨炎(諸如難治性或復發性多軟骨炎)、肺泡蛋白沈積症、澱粉樣變性、鞏膜炎、非癌性淋巴細胞增多症、原發性淋巴細胞增多症(其包括單株B細胞淋巴細胞增多症(例如良性單株丙種球蛋白病及意義未明之單株丙種球蛋白病(MGUS)))、周邊神經病、副腫瘤症候群、離子通道病(諸如癲癇症、偏頭痛、心律不整、肌肉病症、耳聾、失明、週期性麻痺及CNS離子通道病)、自閉症、發炎性肌病、局部區段性腎小球硬化(FSGS)、內分泌眼病、葡萄膜視網膜炎、脈絡膜視網膜炎、自體免疫肝臟科病症、肌肉纖維疼痛、多發性內分泌衰竭、施密特氏症候群(Schmidt's syndrome)、腎上腺炎、胃萎縮、初老期癡呆、脫髓鞘病(諸如自體免疫脫髓鞘病)、糖尿病性腎病、杜絲勒氏症候群(Dressler's syndrome)、斑禿、CREST症候群(鈣質沈著症、雷諾氏現象(Raynaud's phenomenon)、食道蠕動異常、肢端皮膚硬化及毛細管擴張)、男性及女性自體免疫不孕症、混合結

締組織疾病、卡格氏病(Chagas' disease)、風濕熱、反覆流產、農民肺(farmer's lung)、多形性紅斑、心切開術後症候群、庫欣氏症候群(Cushing's syndrome)、養鳥人肺(bird-fancier's lung)、過敏性肉芽腫性血管炎、良性淋巴細胞血管炎、阿爾波特氏症候群(Alport's syndrome)、肺泡炎(諸如過敏性肺泡炎及纖維化肺泡炎)、間質肺病、輸血反應、麻風病、瘧疾、利什曼體病(leishmaniasis)、錐蟲病(kypanosomiasis)、血吸蟲病、蛔蟲病、麴菌病、薩姆普特氏症候群(Sampter's syndrome)、卡普蘭氏症候群(Caplan's syndrome)、登革熱、心內膜炎、心內膜心肌纖維化、彌漫性間質性肺纖維化、間質性肺纖維化、特發性肺纖維化、囊腫性纖維化、眼內炎、持久性隆起性紅斑、胎兒紅血球母細胞增多症、嗜酸性筋膜炎、沙爾曼氏症候群(Shulman's syndrome)、費爾蒂氏症候群(Felty's syndrome)、絲蟲病、睫狀體炎(諸如慢性睫狀體炎、異時性睫狀體炎、虹膜睫狀體炎或富徹氏睫狀體炎(Fuch's cyclitis))、亨諾-絲奇恩賴紫癍(Henoch-Schonlein purpura)、人類免疫缺乏病毒(HIV)感染、埃可病毒感染(echovirus infection)、心肌病、阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)、小病毒感染、風疹病毒感染、疫苗接種後症候群、先天性風疹感染、愛潑斯坦-巴爾病毒(Epstein-Barr virus)感染、流行性腮腺炎、伊萬氏症候群(Evan's syndrome)、自體免疫性腺衰竭、西登哈姆氏舞蹈病(Sydenham's chorea)、鏈球菌感染後腎炎、阻塞血栓性血

[ S ]

管炎、甲狀腺中毒症、脊髓癆、脈絡膜炎、巨細胞多肌痛、內分泌眼病、慢性過敏性肺炎、乾躁性角膜結膜炎、流行性角膜結膜炎、特發性腎臟症候群、微小腎病變、良性家族性及局部缺血再灌注損傷、視網膜自體免疫性、關節炎症、支氣管炎、慢性阻塞性氣管疾病、矽肺病、口瘡、阿弗他性口腔炎(aphthous stomatitis)、動脈硬化病症、無精子產生症(aspermiogenesis)、自體免疫溶血、伯克氏病(Boeck's disease)、冷球蛋白血症、杜普宜特朗氏攣縮(Dupuytren's contracture)、晶狀體過敏性眼內炎(endophthalmia phacoanaphylactica)、過敏性腸炎、麻風結節性紅斑、特發性面神經麻痺、慢性疲勞症候群、風濕性發熱、哈曼-里查氏病(Hamman-Rich's disease)、感覺神經性聽力損失、陣發性血紅素尿、性腺低能症、區域性迴腸炎、白細胞減少症、感染性單核白血球增多症、橫貫性脊髓炎、原發性特發性黏液水腫、腎病、交感性眼炎、肉芽腫性睪丸炎、胰腺炎、急性多神經根炎、壞疽性膿皮病、奎汶氏甲狀腺炎(Quervain's thyroiditis)、後天性脾萎縮、歸因於抗精子抗體之不孕症、非惡性胸腺瘤、白斑病、SCID及愛滋斯坦-巴爾病毒相關疾病、後天性免疫缺乏症候群(AIDS)、寄生蟲疾病(諸如利什曼原蟲病(Leshmania))、中毒性休克症候群、食物中毒、涉及T細胞浸潤之病狀、白血球黏附缺乏、與由細胞激素及T淋巴細胞介導之急性及遲發過敏性相關的免疫反應、涉及白血球滲出之疾病、多器官損傷症候群、抗原-抗體複合物介

導之疾病、抗腎小球基底膜疾病、過敏性神經炎、自體免疫多內分泌病、卵巢炎、原發性黏液水腫、自體免疫萎縮性胃炎、交感性眼炎、風濕病、混合結締組織疾病、腎病症候群、胰島炎、多發性內分泌衰竭、周邊神經病、I型自體免疫多腺症候群、成人發作型特發性副甲狀腺低能症(AOIH)、全頭禿、擴張型心肌病、後天性表皮分解性水皰症(EBA)、血色素沈著症、心肌炎、腎病症候群、原發性硬化性膽管炎、化膿性或非化膿性竇炎、急性或慢性竇炎、篩骨、額骨、上頷骨或蝶骨竇炎、嗜伊紅血球相關病症(諸如嗜伊紅血球增多症、肺部浸潤嗜伊紅血球增多症、嗜伊紅血球增多-肌痛症候群、呂弗勒氏症候群(Loffler's syndrome)、慢性嗜伊紅血球性肺炎、熱帶肺部嗜伊紅血球增多症、支氣管肺炎麴菌病、麴黴腫或含有嗜伊紅血球之肉芽腫)、全身性過敏反應、血清反應陰性之脊椎關節病、多發性內分泌自體免疫疾病、硬化性膽管炎、鞏膜、鞏膜外層、慢性皮膚黏膜念珠菌病、布魯頓氏症候群(Bruton's syndrome)、嬰兒期暫時性低伽馬球蛋白血症、維斯科特-奧爾德里奇症候群(Wiskott-Aldrich syndrome)、共濟失調毛細管擴張症、與膠原病有關之自體免疫病症、風濕、神經性疾病、局部缺血性再灌注病症、血壓降低反應、血管功能障礙、血管擴張、組織損傷、心血管缺血、痛覺過敏、大腦缺血、及伴隨有血管形成之疾病、過敏性病變、絲球體腎炎、再灌注損傷、心肌或其他組織之再灌注損傷、具有急性發炎成分之皮膚病、

[ S ]



急性化膿性腦膜炎或其他中樞神經系統發炎性病徵、粒細胞輸血相關症候群、細胞激素誘發之毒性、急性重度炎症、慢性難治性炎症、腎盂炎、肺硬變、糖尿病性視網膜病、糖尿病性大動脈病徵、動脈內增生、消化性潰瘍、心瓣炎及子宮內膜異位症。

術語「偵測」意欲包括測定物質之存在與否或定量物質之量。因此該術語係指使用本發明之材料、組合物及方法來進行定性及定量測定。一般而言，用於偵測之特定技術對於本發明之實施並不關鍵。

舉例而言，根據本發明「偵測」可包括：觀測 $\alpha 5$ 基因產物、 $\beta 1$ 基因產物(例如 mRNA 分子)或 $\alpha 5$ 或 $\alpha 5\beta 1$ 多肽之存在與否； $\alpha 5$ 或 $\alpha 5\beta 1$ 多肽含量或與標靶結合量之變化； $\alpha 5$ 或 $\alpha 5\beta 1$ 多肽生物功能/活性之變化。在一些實施例中，「偵測」可包括偵測野生型 $\alpha 5$ 或 $\alpha 5\beta 1$ 含量(例如 mRNA 或多肽含量)。偵測可包括定量任何值與對照物相比較時至少約 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100% 或 100% 以上之變化(例如增加或降低)。偵測可包括定量任何值之至少約 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍或 10 倍以上(例如 20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍、100 倍或 100 倍以上)的變化。

本文中所使用之「標記物」係指直接或間接結合至抗體之可偵測化合物或組合物。標記物自身可藉由其自身偵測

(例如放射性同位素標記物或螢光標記物)，或在酶促標記物之情況下，可催化受質化合物或組合物的可偵測之化學變化。

### III. 抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體

本文中提供可結合人類  $\alpha 5\beta 1$  且競爭性抑制抗- $\alpha 5\beta 1$  18C12 抗體與人類  $\alpha 5\beta 1$  之結合的抗體。因此，本發明之一實施例提供包含 SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、7 或 8 中任一者所述之可變輕鏈 (VL) 序列及 SEQ ID NO: 9、10、11、12、13 或 14 中任一者所述之可變重鏈 (VH) 序列的抗體。亦涵蓋本文中所述抗- $\alpha 5\beta 1$  抗體之人類或嵌合 (包括例如人類化) 形式抗體。

根據一實施例，抗體以介於 500 nM 與 1 pM 之間的  $K_d$  結合人類  $\alpha 5\beta 1$ 。在某些實施例中，本文中所提供之抗體具有  $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$  或  $\leq 0.001 \text{ nM}$  (例如  $10^{-8} \text{ M}$  或  $10^{-8} \text{ M}$  以下，例如  $10^{-8} \text{ M}$  至  $10^{-13} \text{ M}$ ，例如  $10^{-9} \text{ M}$  至  $10^{-13} \text{ M}$ ) 之解離常數 ( $K_d$ )。根據另一實施例，抗體不結合  $\alpha V\beta 3$  或  $\alpha V\beta 5$  或  $\alpha V\beta 1$ 。根據另一實施例，抗體包含人類 IgG (例如人類 IgG1 或人類 IgG4) 之 Fc 序列。在另一實施例中，Fc 序列已經改變或變化以使得其缺乏抗體依賴性細胞毒性 (ADCC) 效應功能，此通常與其與 Fc 受體 (FcR) 的結合有關。存在許多可改變效應功能之 Fc 序列變化或突變的實例。舉例而言，WO 00/42072 及 Shields 等人，*J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001) 描述與 FcR 之結合提高或降低的抗體變異體。彼等公開案之內容係特定地以引

[ S ]

用的方式併入本文中。抗體可呈Fab、Fab'、F(ab)'<sub>2</sub>、單鏈Fv(scFv)、Fv片段；雙功能抗體及線抗體形式。又，抗體可為結合至 $\alpha 5\beta 1$ 且為 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗劑，但亦結合一或多種其他標靶且抑制其功能(例如VEGF)之多特異性抗體，或為結合至 $\alpha 5\beta 1$ 上之兩個或兩個以上不同位點的多特異性抗體。抗體可結合至治療劑(例如細胞毒性劑、放射性同位素及化學治療劑)或結合至藉由成像偵測患者樣品中或活體內之 $\alpha 5\beta 1$ 之標記物(例如放射性同位素、螢光染料及酶)。

亦涵蓋編碼抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體之核酸分子、包含編碼一或兩個可變域之核酸分子之表現載體及包含該等核酸分子之細胞。此等抗體可用於本文中所述之療法中且用以偵測患者樣品中(例如使用FACS、免疫組織化學(IHC)、ELISA檢定)或患者體內之 $\alpha 5\beta 1$ 蛋白。

#### A. 單株抗體

單株抗體可例如使用融合瘤方法(諸如Kohler及Milstein, *Nature*, 256:495 (1975)所述之方法)製備，或可藉由重組DNA方法(美國專利第4,816,567號)製得，或可藉由下文實例中之本文所述方法產生。在融合瘤方法中，倉鼠、小鼠或其他適當宿主動物通常經免疫劑(例如單獨或與適合載劑組合之 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 或 $\alpha 5\beta 1$ 多肽)免疫以引出產生或能夠產生將特異性結合至該免疫劑之抗體的淋巴細胞。或者，淋巴細胞可經活體外免疫。

免疫劑通常將包括相關蛋白質之多肽或融合蛋白或包含該蛋白質之組合物。一般而言，若需要人類來源之細胞，

則使用周邊血淋巴細胞(「PBL」); 或若需要非人類哺乳動物來源, 則使用脾細胞或淋巴結細胞。隨後使用諸如聚乙二醇之適合融合劑將淋巴細胞與永生化細胞株融合以形成融合瘤細胞。Goding, *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE* (New York: Academic Press, 1986), 第59-103頁。永生化細胞株通常為經轉化之哺乳動物細胞, 尤其為齧齒動物、牛及人類來源之骨髓瘤細胞。通常採用大鼠或小鼠骨髓瘤細胞株。可將融合瘤細胞於適合培養基中培養, 該培養基較佳含有一或多種抑制未融合之永生化細胞生長或存活的物質。舉例而言, 若親本細胞缺乏酶次黃嘌呤鳥嘌呤焦磷酸核糖轉移酶(HGPRT或HPRT), 則融合瘤之培養基通常將包括次黃嘌呤、胺基蝶呤及胸苷(「HAT培養基」), 該等物質阻止HGPRT缺乏細胞之生長。

較佳之永生化細胞株為有效融合、支持藉由所選抗體產生細胞穩定高程度表現抗體及對諸如HAT培養基之培養基敏感的細胞株。更佳之永生化細胞株為鼠類骨髓瘤細胞株, 其可獲自例如Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California及美國菌種保存中心(American Type Culture Collection, Manassas, Virginia)。亦已描述用於產生人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類雜合骨髓瘤細胞株。Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur等人, *MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION TECHNIQUES AND APPLICATIONS* (Marcel Dekker, Inc.:

[ S ]

New York, 1987), 第 51-63 頁。

隨後可在培養融合瘤細胞之培養基中檢定針對多肽之單株抗體的存在。可藉由免疫沈澱或藉由活體外結合檢定(諸如放射免疫檢定(RIA)或酶聯結免疫吸附劑檢定(ELISA))測定由融合瘤細胞所產生之單株抗體之結合特異性。此項技術中已知此等技術及檢定。可例如藉由 Munson 及 Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980) 之史卡查分析(Scatchard analysis)來測定單株抗體之結合親和力。

在鑑別出所需融合瘤細胞之後，可藉由限制稀釋程序將純系次選殖且藉由標準方法使其生長。Goding, 同上。適於達成此目的之培養基包括例如杜貝卡氏改良依格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)及 RPMI-1640 培養基。或者，可使融合瘤細胞在哺乳動物體內以腹水形式活體內生長。

由次純系分泌之單株抗體可藉由諸如蛋白 A-瓊脂糖、羥基磷灰石層析、凝膠電泳、透析或親和層析之習知免疫球蛋白純化程序自培養基或腹水液中分離或純化。

亦可藉由諸如美國專利第 4,816,567 號中所述之重組 DNA 方法製得單株抗體。可使用習知程序(例如藉由使用能夠與編碼鼠類抗體之重鏈及輕鏈之基因特異性結合的寡核苷酸探針)輕易地分離且定序編碼本發明單株抗體之 DNA。本發明之融合瘤細胞充當此 DNA 之較佳來源。經分離後，可將 DNA 置於表現載體中，隨後將表現載體轉染至不另外產生免疫球蛋白之宿主細胞(諸如猿 COS 細胞、中國倉鼠卵

巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞)中，以在重組宿主細胞內獲得單株抗體的合成。亦可例如藉由以人類重鏈及輕鏈恆定域之編碼序列替代同源鼠類序列(美國專利第4,816,567號；Morrison等人，同上)，或藉由將非免疫球蛋白多肽之編碼序列之全部或一部分共價結合至免疫球蛋白編碼序列來修飾DNA。此非免疫球蛋白多肽可替代本發明抗體之恆定域，或可替代本發明抗體之一個抗原結合位點的可變域以產生嵌合二價抗體。

抗體可為單價抗體。此項技術中已知製備單價抗體之方法。舉例而言，一種方法涉及免疫球蛋白輕鏈及經修飾重鏈之重組表現。一般重鏈在Fc區中之任一點截短以防止重鏈交聯。或者，相關半胱胺酸殘基經另一胺基酸殘基取代或缺失以防止交聯。

活體外方法亦適於製備單價抗體。可使用(但不限於)此項技術中已知之技術來達成抗體消化以產生其片段，尤其Fab片段。

### **B. 人類抗體**

在某些實施例中，本文中所提供之抗體為人類抗體。可使用此項技術中已知之各種技術來製備人類抗體。人類抗體一般描述於 van Dijk 及 van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001)；及 Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008)。

可藉由免疫原投與已經修飾以對於抗原攻擊反應而產生完整人類抗體或具有人類可變區之完整抗體之轉殖基因動

[ S ]

物來製備人類抗體。此等動物通常含有全部或一部分人類免疫球蛋白基因座，替代內源免疫球蛋白基因座，或存在於染色體外或隨機整合於動物染色體內。在此轉殖基因小鼠中，內源免疫球蛋白基因座一般已經不活化。關於自轉殖基因動物獲得人類抗體之方法的回顧，參見 Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)。亦參見例如描述 XENOMOUSE™ 技術之美國專利第 6,075,181 號及第 6,150,584 號；描述 HUMAB® 技術之美國專利第 5,770,429 號；描述 K-M MOUSE® 技術之美國專利第 7,041,870 號；及描述 VELOCIMOUSE® 技術之美國專利申請公開案第 US 2007/0061900 號。此等動物產生之完整抗體之人類可變區可進一步修飾，例如藉由與不同人類恆定區組合。

人類抗體亦可藉由基於融合瘤之方法製得。用於產生人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類雜合骨髓瘤細胞株已經描述。(參見例如 Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984)；Brodeur 等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第 51-63 頁 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)；及 Boerner 等人, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)。)經由人類 B 細胞融合瘤技術產生之人類抗體亦於 Li 等人, *PNAS. USA*, 103:3557-3562 (2006) 中描述。其他方法包括例如美國專利第 7,189,826 號 (描述自融合瘤細胞株產生單株人類 IgM 抗體) 及 Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (描述人類-人類融合瘤) 中所述之彼等方法。人類融合瘤技術 (Trioma 技術) 亦於 Vollmers 及

Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005)；及 Vollmers及 Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)中描述。

亦可藉由分離選自源自人類噬菌體呈現文庫之Fv純系可變域序列產生人類抗體。隨後可將此等可變域序列與所需人類恆定域組合。下文描述自抗體文庫選擇人類抗體的技術。

### C.源自文庫之抗體

可藉由在組合文庫中篩選具有所需活性之抗體來分離本發明抗體。舉例而言，此項技術中已知多種用於產生噬菌體呈現文庫且在此等文庫中篩選具有所需結合特徵之抗體的方法。此等方法於例如 Hoogenboom等人, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等人編, Human Press, Totowa, NJ, 2001)中評述且進一步於例如 McCafferty等人, *Nature* 348:552-554；Clackson等人, *Nature* 352: 624-628 (1991)；Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992)；Marks及 Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo編, Human Press, Totowa, NJ, 2003)；Sidhu等人, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004)；Lee等人, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004)；Fellouse, *PNAS USA* 101(34): 12467-12472 (2004)；及 Lee等人, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004)中描述。

在某些噬菌體呈現方法中，VH及VL基因譜係藉由聚合

[ S ]



酶鏈反應(PCR)分別選殖且隨機重組於噬菌體文庫中，隨後可如 Winter 等人, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994) 中所述在其中篩選抗原結合噬菌體。噬菌體通常呈現單鏈 Fv(scFv) 片段或 Fab 片段形式之抗體片段。來自經免疫來源之文庫無需建構融合瘤即可提供免疫原之高親和力抗體。或者，天然譜可經選殖(例如自人類)以在無任何免疫之情況下提供針對多種非自抗原以及自抗原之抗體單一來源，如 Griffiths 等人, *EMBO J*, 12: 725-734 (1993) 所述。最後，亦可藉由自幹細胞選殖未重排 V 基因區段且使用含有隨機序列之 PCR 引子來編碼高變性 CDR3 區且實現活體外重排來合成製得天然文庫，如 Hoogenboom 及 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992) 所述。描述人類抗體噬菌體文庫之專利公開案包括例如：美國專利第 5,750,373 號，及美國專利公開案第 2005/0079574 號、第 2005/0119455 號、第 2005/0266000 號、第 2007/0117126 號、第 2007/0160598 號、第 2007/0237764 號、第 2007/0292936 號及第 2009/0002360 號。

自人類抗體文庫分離之抗體或抗體片段被視作本文之人類抗體或人類抗體片段。

#### **D. 嵌合及人類化抗體**

在某些實施例中，本文中所提供之抗體為嵌合抗體。某些嵌合抗體於例如美國專利第 4,816,567 號；及 Morrison 等人, *PNAS USA*, 81:6851-6855 (1984) 中描述。在一實施例中，嵌合抗體包含非人類可變區(例如源自小鼠、大鼠、



倉鼠、兔或諸如猴之非人類靈長類動物之可變區)及人類恆定區。在另一實例中，嵌合抗體為種類或子類已自親本抗體之種類或子類發生變化的「種類轉變」抗體。嵌合抗體包括其抗原結合片段。

在某些實施例中，嵌合抗體為人類化抗體。通常，非人類抗體經人類化以降低對人類之免疫原性，同時保持親本非人類抗體之特異性及親和力。一般而言，人類化抗體包含一或多個可變域，其中HVR(例如CDR，或其部分)係源自非人類抗體，且FR(或其部分)係源自人類抗體序列。人類化抗體視情況亦將包含人類恆定區之至少一部分。在一些實施例中，人類化抗體中之一些FR殘基經來自非人類抗體(例如HVR殘基所源自之抗體)之相應殘基取代，例如以恢復或改良抗體特異性或親和力。

人類化抗體及其製備方法於例如 Almagro 及 Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) 中評述，且進一步於例如 Riechmann 等人, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen 等人, *PNAS USA* 86:10029-10033 (1989); 美國專利第 5,821,337 號、第 7,527,791 號、第 6,982,321 號及第 7,087,409 號; Kashmiri 等人, *Methods* 36:25-34 (2005)(描述 SDR(a-CDR)移植); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991)(描述「表面重整」); Dall'Acqua 等人, *Methods* 36:43-60 (2005)(描述「FR改組」); 及 Osbourn 等人, *Methods* 36:61-68 (2005) 及 Klimka 等人, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000)(描述FR改組之「導向選擇」方法)中描

[ S ]

述。

可用於人類化之人類構架區包括(但不限於)：使用「最佳擬合」法選擇之構架區(參見例如Sims等人, *J. Immunol.* 151:2296 (1993))；源自特定子群之輕鏈或重鏈可變區之人類抗體共同序列的構架區(參見例如Carter等人, *PNAS USA*, 89:4285 (1992)；及Presta等人, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993))；人類成熟(體細胞突變)構架區或人類生殖系構架區(參見例如Almagro及Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008))；及源自篩選FR文庫之構架區(參見例如Baca等人, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997)及Rosok等人, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996))。

#### E. 多特異性抗體

在某些實施例中，本文中所提供之抗體為多特異性抗體，例如雙特異性抗體。多特異性抗體為對至少兩個不同位點具有結合特異性之單株抗體。在某些實施例中，一種結合特異性係針對 $\alpha 5\beta 1$ 而另一種係針對任何其他抗原(例如VEGF)。在某些實施例中，雙特異性抗體可結合至 $\alpha 5\beta 1$ 之兩個不同抗原決定基。雙特異性抗體亦可用於將細胞毒性劑定位於表現 $\alpha 5\beta 1$ 之細胞。雙特異性抗體可製成全長抗體或抗體片段形式。

製造多特異性抗體之技術包括(但不限於)具有不同特異性之兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之重組共表現(參見Milstein及Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)；WO 93/08829；及Traunecker等人, *EMBO J.* 10: 3655 (1991))，及「孔中旋

鈕 (knob-in-hole) 」工程改造 (參見例如美國專利第 5,731,168 號)。亦可藉由以下方法製得多特異性抗體：工程改造用於製備抗體 Fc-異二聚分子的靜電導引作用 (WO 2009/089004A1)；將兩種或兩種以上抗體或片段交聯 (參見例如美國專利第 4,676,980 號，及 Brennan 等人，*Science*, 229: 81 (1985))；使用白胺酸拉鏈來產生雙特異性抗體 (參見例如 Kostelny 等人，*J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992))；使用「雙功能抗體」技術來製得雙特異性抗體片段 (參見例如 Hollinger 等人，*PNAS USA*, 90:6444-6448 (1993))；及使用單鏈 Fv(sFv) 二聚體 (參見例如 Gruber 等人，*J. Immunol.*, 152:5368 (1994))；及如例如 Tutt 等人，*J. Immunol.* 147: 60 (1991) 中所述製備三特異性抗體。

本文中亦包括具有三個或三個以上功能性抗原結合位點之經工程改造抗體，包括「章魚抗體 (Octopus antibodies)」 (參見例如 US 2006/0025576A1)。本文中之抗體或片段亦包括包含結合至  $\alpha 5\beta 1$  以及另一不同抗原之抗原結合位點的「雙重作用 Fab」或「DAF」 (例如參見 US 2008/0069820)。

#### F. 抗體變異體

在某些實施例中，涵蓋本文中所提供抗體之胺基酸序列變異體。舉例而言，可能需要其來改良抗體之結合親和力及/或其他生物特性。可藉由在編碼抗體之核苷酸序列中引入適當修飾或藉由肽合成來製備抗體之胺基酸序列變異體。此等修飾包括例如自抗體胺基酸序列內之殘基缺失及/

或插入其中及/或對其進行取代。可進行缺失、插入及取代之任何組合以獲得最終構築體，其限制條件為最終構築體具有所需特徵，例如抗原結合。

### 1. 取代、插入及缺失變異體

在某些實施例中，提供具有一或多個胺基酸取代之抗體變異體。用於取代性突變誘發之相關位點包括HVR及FR。保守性取代於表1中「保守性取代」之標題下展示。更多實質性變化於表1中之「例示性取代」之標題下提供且如下文關於胺基酸側鏈種類進一步描述。可將胺基酸取代引入相關抗體中且篩選具有所需活性，例如保持/改良之抗原結合、降低之免疫原性、或改良之ADCC或CDC之產物。

表 1

原始殘基	例示性取代	較佳取代
Ala (A)	Val ; Leu ; Ile	Val
Arg (R)	Lys ; Gln ; Asn	Lys
Asn (N)	Gln ; His ; Asp, Lys ; Arg	Gln
Asp (D)	Glu ; Asn	Glu
Cys (C)	Ser ; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn ; Glu	Asn
Glu (E)	Asp ; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn ; Gln ; Lys ; Arg	Arg
Ile (I)	Leu ; Val ; Met ; Ala ; Phe ; 正白胺酸	Leu
Leu (L)	正白胺酸 ; Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe	Ile
Lys (K)	Arg ; Gln ; Asn	Arg
Met (M)	Leu ; Phe ; Ile	Leu
Phe (F)	Trp ; Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val ; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp ; Phe ; Thr ; Ser	Phe
Val (V)	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; 正白胺酸	Leu

可根據常見側鏈特性將胺基酸分組：

- (1) 疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 鹼性：His、Lys、Arg；
- (5) 影響鏈取向之殘基：Gly、Pro；
- (6) 芳香性：Trp、Tyr、Phe。

非保守性取代將需要將一種此等種類中之成員換成另一種類。

一種類型之取代變異體涉及取代親本抗體(例如人類化抗體或人類抗體)之一或多個高變區殘基。一般而言，選擇用於進一步研究之所得變異體之某些生物學特性相對於親本抗體改變(例如改良)(例如親和力增加、免疫原性降低)及/或將實質上保持親本抗體之某些生物學特性。例示性取代變異體為親和力成熟抗體，其可例如使用基於噬菌體呈現之親和力成熟技術(諸如本文中所述之彼等)便利地產生。簡言之，一或多個HVR殘基突變且變異抗體呈現於噬菌體上且針對特定生物活性(例如結合親和力)對其進行篩選。

可在HVR中進行改變(例如取代)，例如以改良抗體親和力。此等改變可於HVR「熱點」，亦即由在體細胞成熟過程中經歷高頻率突變之密碼子編碼之殘基中進行(參見例如Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008))；及/或於SDR(a-CDR)，其中測試所得變異VH或VL之結合親和

力。藉由建構且自第二文庫重新選擇而獲得之親和力成熟已於例如Hoogenboom等人, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37(O'Brien 等人編, Human Press, Totowa, NJ, (2001).)中描述。在親和力成熟之一些實施例中, 藉由多種方法(例如易錯PCR(error-prone PCR)、鏈改組或寡核苷酸定向突變誘發)中任一種將多樣性引入經選擇以供成熟之可變基因中。隨後產生第二文庫。隨後篩選該文庫以鑑別具有所需親和力之任何抗體變異體。另一引入多樣性之方法涉及HVR定向方法, 其中隨機選擇若干個HVR殘基(例如每次4-6個殘基)。可例如使用丙胺酸掃描突變誘發或模型化特定地鑑別抗原結合中所涉及之HVR殘基。特定言之通常靶向CDR-H3及CDR-L3。

在某些實施例中, 取代、插入或缺失可在一或多個HVR內進行, 只要此等改變不實質上降低抗體結合抗原之能力即可。舉例而言, 可在HVR中進行不實質上降低結合親和力之保守性改變(例如如本文中所提供之保守性取代)。此等改變可在HVR「熱點」或SDR外部。在上文提供之變異VH及VL序列之某些實施例中, 各HVR未經改變, 或含有不超過一個、兩個或三個胺基酸取代。

適用於鑑別可靶向以供突變誘發之抗體之殘基或區域的方法稱作「丙胺酸掃描突變誘發」, 如Cunningham及Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所述。在此方法中, 殘基或靶殘基之群(例如諸如arg、asp、his、lys及glu之帶電殘基)經鑑別且由中性或帶負電胺基酸(例如丙胺酸或聚丙胺酸)

置換以確定是否影響抗體與抗原之相互作用。可在對初始取代顯示功能敏感性之胺基酸位置處引入其他取代。或者或另外，抗原-抗體複合物之晶體結構用於鑑別抗體與抗原之間的接觸點。此等接觸殘基及鄰近殘基可作為取代候選物經靶向或消除。可篩選變異體以確定其是否含有所需特性。

胺基酸序列插入物包括長度在一個殘基至含有一百個或一百個以上殘基之多肽範圍內之胺基端及/或羧基端融合體，以及單個或多個胺基酸殘基之序列內插入物。末端插入物之實例包括具有N端甲硫胺醯基殘基之抗體。抗體分子之其他插入變異體包括抗體之N端或C端與酶(例如對於ADEPT而言)或增加抗體之血清半衰期之多肽的融合體。

## 2. 糖基化變異體

在某些實施例中，本文中所提供之抗體經改變以增加或降低抗體經糖基化之程度。對抗體之糖基化位點之添加或缺失可藉由改變胺基酸序列以便產生或移除一或多個糖基化位點而便利地實現。

若抗體包含Fc區，則與其連接之醣類可經改變。由哺乳動物細胞產生之天然抗體通常包含一般藉由N鍵與Fc區之CH2域之Asn297連接的分支鏈雙觸角寡醣。參見例如Wright等人，*TIBTECH* 15:26-32 (1997)。寡醣可包括多種醣類，例如甘露糖、N-乙醯基葡糖胺(GlcNAc)、半乳糖及唾液酸，以及與雙觸角寡醣結構之「主幹」中之GlcNAc連接的海藻糖。在一些實施例中，可對本發明抗體中之寡



醣進行修飾以產生具有某些改良特性之抗體變異體。

在一實施例中，提供具有缺乏與Fc區連接(直接或間接)之海藻糖之醣結構的抗體變異體。舉例而言，此抗體中海藻糖之量可為1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。藉由相對於根據MALDI-TOF質譜法所量測之所有與Asn 297連接之醣結構(例如複合物、雜合物及高甘露糖結構)的總和，計算糖鏈內Asn297處海藻糖之平均量來測定海藻糖之量，例如如WO 2008/077546中所述。Asn297係指位於Fc區中約位置297處(Fc區殘基之Eu編號)之天冬醯胺殘基；然而，由於抗體中之微小序列變化，Asn297亦可能位於位置297上游或下游約±3個胺基酸處，亦即介於位置294與300之間。此等海藻糖基化變異體可具有改良之ADCC功能。參見例如美國專利公開案第US 2003/0157108號(Presta, L.)；第US 2004/0093621號(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。與「脫除海藻糖基」或「海藻糖缺乏」抗體變異體有關之公開案的實例包括：US 2003/0157108；WO 2000/61739；WO 2001/29246；US 2003/0115614；US 2002/0164328；US 2004/0093621；US 2004/0132140；US 2004/0110704；US 2004/0110282；US 2004/0109865；WO 2003/085119；WO 2003/084570；WO 2005/035586；WO 2005/035778；WO 2005/053742；WO 2002/031140；Okazaki 等人，*J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki 等人，*Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)。能夠產生脫除海藻糖基之抗體之細胞株的實例包括蛋白質海



藻糖基化缺乏之 Lec13 CHO 細胞 (Ripka 等人, *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); 美國專利申請案第 US 2003/0157108 A1 號, Presta, L; 及 WO 2004/056312 A1, Adams 等人, 尤其實例 11); 及基因剔除細胞株, 諸如  $\alpha$ -1,6-海藻糖基轉移酶基因、*FUT8*、基因剔除 CHO 細胞 (參見例如 Yamane-Ohnuki 等人, *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. 等人, *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); 及 WO 2003/085107)。

進一步提供具有對分寡醣 (bisected oligosaccharide) 之抗體變異體, 例如其中與抗體之 Fc 區連接的雙觸角寡醣經 GlcNAc 對分。此等抗體變異體可具有降低之海藻糖基化及/或改良之 ADCC 功能。此等抗體變異體之實例例如於 WO 2003/011878 (Jean-Mairet 等人); 美國專利第 6,602,684 號 (Umana 等人); 及 US 2005/0123546 (Umana 等人) 中描述。亦提供在與 Fc 區連接之寡醣中具有至少一個半乳糖殘基的抗體變異體。此等抗體變異體可具有改良之 CDC 功能。此等抗體變異體於例如 WO 1997/30087 (Patel 等人); WO 1998/58964 (Raju, S.); 及 WO 1999/22764 (Raju, S.) 中描述。

### 3. Fc 區變異體

在某些實施例中, 可在本文中所提供抗體之 Fc 區中引入一或多個胺基酸修飾, 藉此產生 Fc 區變異體, 以便增強例如抗體治療涉及異常血管生成及/或血管滲透性或滲漏之疾病或病症的有效性。Fc 區變異體可包含在一或多個胺基

酸位置處包含胺基酸修飾(例如取代)之人類Fc區序列(例如人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)。

在某些實施例中，本發明涵蓋具有一些但非所有效應功能之抗體變異體，此使其成為某些應用之理想候選物，在該等應用中抗體之活體內半衰期係重要的，但某些效應功能(諸如補體及ADCC)為不必要或有害的。可進行活體外及/或活體內細胞毒性檢定以確認CDC及/或ADCC活性之降低/衰竭。舉例而言，可進行Fc受體(FcR)結合檢定以確保抗體缺乏FcγR結合(因此可能缺乏ADCC活性)，但保持FcRn結合能力。介導ADCC之初級細胞NK細胞僅表現FcγRIII，而單核細胞表現FcγRI、FcγRII及FcγRIII。FcR在造血細胞上之表現於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)之第464頁上的表3中概述。評定相關分子之ADCC活性之活體外檢定的非限制性實例於美國專利第5,500,362號(參見例如Hellstrom, I.等人, *PNAS USA* 83:7059-7063 (1986))及Hellstrom, I等人, *PNAS USA* 82:1499-1502 (1985)；第5,821,337號(參見Bruggemann, M.等人, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987))中描述。或者，可採用非放射性檢定方法(參見例如用於流動式細胞量測術之ACTI™非放射性細胞毒性檢定(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA)；及CytoTox 96®非放射性細胞毒性檢定(Promega, Madison, WI))。適用於此等檢定之效應細胞包括周邊血單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。或者或另外，相關分子之ADCC活性可於活體內評定，例如在



諸如 Clynes 等人, *PNAS USA* 95:652-656 (1998) 中所揭示之動物模型中評定。亦可進行 C1q 結合檢定以證明抗體無法結合 C1q 且因此缺乏 CDC 活性。參見例如 WO 2006/029879 及 WO 2005/100402 中之 C1q 及 C3c 結合 ELISA。為評定補體活化, 可進行 CDC 檢定(參見例如 Gazzano-Santoro 等人, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. 等人, *Blood* 101:1045-1052 (2003); 及 Cragg, M.S. 及 M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004))。亦可使用此項技術中已知之方法進行 FcRn 結合及活體內清除/半衰期測定(參見例如 Petkova, S.B. 等人, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006))。

效應功能降低之抗體包括取代 Fc 區殘基 238、265、269、270、297、327 及 329 中一或多者之彼等抗體(美國專利第 6,737,056 號)。此等 Fc 突變體包括在胺基酸位置 265、269、270、297 及 327 之兩個或兩個以上位置處具有取代的 Fc 突變體, 包括殘基 265 及 297 取代為丙胺酸的所謂的「DANA」Fc 突變體(美國專利第 7,332,581)。

描述某些與 FcR 之結合改良或減少的抗體變異體。(參見例如美國專利第 6,737,056 號; WO 2004/056312; 及 Shields 等人, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)。)

在某些實施例中, 抗體變異體包含具有一或多個改良 ADCC 之胺基酸取代的 Fc 區, 例如在 Fc 區之位置 298、333 及/或 334(殘基之 EU 編號)處取代。

在一些實施例中, 在 Fc 區中進行改變, 其導致 C1q 結合

[ S ]

及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)改變(亦即,改良或降低),例如如美國專利第6,194,551號、WO 99/51642及Idusogie等人,*J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)中所述。

可在Fc區序列中進行突變或改變以改良FcR結合(例如FcγR、FcRn)。根據一實施例,本發明之抗體具有至少一種選自由以下組成之群之相較天然IgG或親本抗體改變之效應功能:ADCC、CDC及改良FcRn結合。若干種適用之特定突變之實例於例如Shields, RL等人,(2001) *JBC* 276(6)6591-6604; Presta, L.G., (2002) *Biochemical Society Transactions* 30(4):487-490; 及WO 00/42072中描述。US 2005/0014934A1(Hinton等人)中描述具有增加之半衰期及經改良之與新生兒Fc受體(FcRn)之結合的抗體,其中FcRn負責將母體IgG轉移至胎兒(Guyer等人,*J. Immunol.* 117:587 (1976)及Kim等人,*J. Immunol.* 24:249 (1994))。彼等抗體包含具有一或多個取代之Fc區,該等取代改良Fc區與FcRn之結合。此等Fc變異體包括在Fc區殘基238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434中之一或多者處具有取代(例如取代Fc區殘基434)之彼等Fc變異體(美國專利第7,371,826號)。

關於Fc區變異體之其他實例,亦參見Duncan及Winter,*Nature* 322:738-40 (1988); 美國專利第5,648,260號; 美國專利第5,624,821號; 及WO 94/29351。

#### 4. 經半胱胺酸工程改造之抗體變異體

在某些實施例中，可能需要產生經半胱胺酸工程改造之抗體，例如「硫代MAb」，其中抗體之一或多個殘基經半胱胺酸殘基取代。在特定實施例中，經取代之殘基出現在抗體之可接近位點處。藉由用半胱胺酸取代彼等殘基，反應性硫醇基團藉此定位於抗體之可接近位點處且可用於將抗體結合至其他部分(諸如藥物部分或連接子-藥物部分)，以產生如本文中進一步描述之免疫結合物。在某些實施例中，任一或多個以下殘基可經半胱胺酸取代：輕鏈之V205(Kabat編號)；重鏈之A118(EU編號)；及重鏈Fc區之S400(EU編號)。可如例如美國專利第7,521,541號中所述產生經半胱胺酸工程改造之抗體。

在一些實施例中，可在Fc區中引入半胱胺酸殘基，藉此在此區域中形成鏈間雙硫鍵。因此產生之均二聚抗體可具有改良之內化能力及/或增加之補體介導性細胞殺死及抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。參見Caron等人, *J. Exp. Med.*, 176: 1191-1195 (1992)及Shopes, *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992)。亦可使用異雙功能交聯劑製備具有增強之抗腫瘤活性的均二聚抗體，如Wolff等人, *Cancer Research*, 53: 2560-2565 (1993)中所述。或者，抗體可經工程改造為具有雙Fc區且藉此可具有增強之補體溶解及ADCC能力。參見Stevenson等人, *Anti-Cancer Drug Design*, 3: 219-230 (1989)。

### 5. 抗體衍生物

在某些實施例中，本文中所提供之抗體可進一步經修飾

為含有此項技術中已知且輕易獲得之其他非蛋白質部分。適於抗體衍生作用之部分包括(但不限於)水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、聚葡萄糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、聚-1,3-二氧戊環、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)、及聚葡萄糖或聚(n-乙烯吡咯啉酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇、及其混合物。聚乙二醇丙醛因其於水中之穩定性而可具有製造優勢。聚合物可具有任何分子量，且可有分支或無分支。與抗體連接之聚合物的數目可變化，且若連接一種以上聚合物，則其可為相同或不同分子。一般而言，用於衍生作用之聚合物數目及/或類型可基於包括(但不限於)以下之考慮因素來確定：欲改良抗體之特定特性或功能、抗體衍生物是否將用於指定條件下之療法等。

在另一實施例中，提供抗體與可藉由曝露於輻射來選擇性加熱之非蛋白質部分的結合物。在一實施例中，非蛋白質部分為碳奈米管(Kam等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005))。該輻射可具有任何波長，且包括(但不限於)不損傷普通細胞但能將非蛋白質部分加熱至可殺死抗體-非蛋白質部分附近之細胞之溫度的波長。

### G. 免疫結合物

本發明亦提供包含本文中之抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體與一或多種細

胞毒性劑(諸如化學治療劑或藥物、生長抑制劑、毒素(例如蛋白質毒素、細菌、真菌、植物或動物來源之酶促活性毒素，或其片段))或放射性同位素結合之免疫結合物。

在一實施例中，免疫結合物為抗體-藥物結合物(ADC)，其中抗體係與一或多種藥物結合，該等藥物包括(但不限於)類美登素(參見美國專利第5,208,020號、第5,416,064號及歐洲專利EP 0 425 235 B1)；奧利司他汀(auristatin)，諸如單甲基奧利司他汀藥物部分DE及DF(MMAE及MMAF)(參見美國專利第5,635,483號及第5,780,588號，及第7,498,298號)；海兔毒素；卡奇黴素或其衍生物(參見美國專利第5,712,374號、第5,714,586號、第5,739,116號、第5,767,285號、第5,770,701號、第5,770,710號、第5,773,001號及第5,877,296號；Hinman等人，*Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993)；及Lode等人，*Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998))；蒽環黴素(anthracycline)，諸如道諾黴素(daunomycin)或小紅莓(參見Kratz等人，*Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006)；Jeffrey等人，*Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006)；Torgov等人，*Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005)；Nagy等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000)；Dubowchik等人，*Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002)；King等人，*J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002)；及美國專利第6,630,579號)；甲胺喋呤；長春地辛；紫杉烷(taxane)，諸如歐洲紫杉醇(docetaxel)、太平洋紫杉醇、拉洛紫杉醇(larotaxel)、

[ S ]



特賽紫杉醇(tesetaxel)及奧他紫杉醇(ortataxel)；單端孢徽烯族毒素；及CC1065。

在另一實施例中，免疫結合物包含如本文中所述之抗體與酶促活性毒素或其片段結合，該酶促活性毒素或其片段包括(但不限於)白喉(diphtheria)A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素(ricin)A鏈、相思子鹼(abrin)A鏈、莫迪素(modeccin)A鏈、帚麴菌素( $\alpha$ -sarcin)、油桐蛋白(*Aleurites fordii* protein)、康乃馨蛋白(dianthin protein)、洋商陸蛋白(*Phytolaca americana* protein)(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜抑制劑(*momordica charantia* inhibitor)、麻瘋樹毒蛋白(curcin)、巴豆毒素(crotonin)、石鹹草抑制劑(*sapaonaria officinalis* inhibitor)、白樹素(gelonin)、有絲分裂素(mitogellin)、侷限麴菌素(restrictocin)、酚徽素(phenomycin)、依諾徽素(enomycin)及徽菌毒素(tricothecene)。

在另一實施例中，免疫結合物包含如本文中所述之抗體與放射性原子結合形成放射性結合物。多種放射性同位素可用於製備放射性結合物。實例包括At<sup>211</sup>、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>、Sm<sup>153</sup>、Bi<sup>212</sup>、P<sup>32</sup>、Pb<sup>212</sup>；及Lu之放射性同位素。當使用放射性結合物進行偵測時，其可包含用於閃爍攝影研究之放射性原子，例如tc99m或I123；或用於核磁共振(NMR)成像(亦稱為磁共振成像，mri)之自旋標記物，諸如碘-123及碘-131、銻-111、氟-19、碳-13、

氮-15、氧-17、鈾、錳或鐵。

抗體與細胞毒性劑之結合物可使用多種雙功能蛋白質偶合劑製得，諸如N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯 (SPDP)、丁二醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯 (SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷 (IT)、醯亞胺酯之雙功能衍生物(諸如二亞胺代己二酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙-疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮鹽衍生物(諸如雙-(對重氮鹽苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如2,6-二異氰酸甲苯酯)、及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如 Vitetta 等人, *Science* 238:1098 (1987) 中所述來製備。碳14標記之1-異硫氰基苄基-3-甲基二伸乙三胺五乙酸 (MX-DTPA) 為用於使放射性核苷酸與抗體結合之例示性螯合劑。參見 WO 94/11026。連接子可為促進細胞毒性藥物在細胞中釋放之「可裂解連接子」。舉例而言，可使用酸不穩定連接子、肽酶敏感性連接子、光不穩定連接子、二甲基連接子或含雙硫鍵之連接子 (Chari 等人, *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); 美國專利第5,208,020號)。

本文中之免疫結合物或ADC明確涵蓋(但不限於)用交聯劑試劑製備之此等結合物，該等交聯劑試劑包括(但不限於)：BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺酸基-EMCS、磺酸基-GMBS、磺酸基-KMUS、磺酸基-

[ S 1

MBS、磺酸基-SIAB、磺酸基-SMCC及磺酸基-SMPB，及SVSB(丁二醯亞胺基-(4-乙烯基砜)苯甲酸酯)，該等交聯劑試劑可購得(例如購自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)。

#### H. 免疫脂質體

本文中所揭示之抗體亦可經調配成免疫脂質體。含有該抗體之脂質體係藉由此項技術中已知之方法來製備，諸如Epstein等人，*PNAS USA*, 82: 3688 (1985)；Hwang等人，*PNAS USA*, 77: 4030 (1980)；及美國專利第4,485,045號及第4,544,545號中所述。具有增加之循環時間之脂質體於美國專利第5,013,556號中揭示。

尤其適用之脂質體可藉由逆相蒸發方法由包含磷脂醯膽鹼、膽固醇及PEG衍生之磷脂醯乙醇胺(PEG-PE)之脂質組合物產生。脂質體經由具有界定孔徑之過濾器擠出產生具有所需直徑之脂質體。本發明抗體之Fab'片段可經由二硫化物互換反應與如Martin等人，*J. Biol. Chem.*, 257: 286-288 (1982)中所述之脂質體結合。抗贅生劑、生長抑制劑或化學治療劑(諸如小紅莓)視情況亦含於脂質體內。參見Gabizon等人，*J. National Cancer Inst.*, 81(19): 1484 (1989)。

#### IV. 使用抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體之治療方法

任何本文中所提供之抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體均可用於治療方法中。應瞭解本文所述之任何調配物或治療方法可使用本發明之免疫結合物來替代抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體或除抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體之

外亦使用本發明之免疫結合物。

在一態樣中，提供用作藥物之抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體。在進一步之態樣中，提供用於治療涉及異常血管生成及/或血管滲透性或滲漏之疾病及病症(包括例如癌症、眼疾病及免疫病症(例如自體免疫病症))的抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體。在某些實施例中，提供用於治療方法中之抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體。在某些實施例中，本發明提供用於治療患有涉及異常血管生成及/或血管滲透性或滲漏之疾病或病症之個體的方法中之抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體，該方法包含向該個體投與有效量之抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體。在一個此實施例中，方法進一步包含向個體投與有效量之至少一種、兩種、三種、四種或四種以上額外治療劑，包括例如如本文中所述之抗血管生成劑、抗贅生劑、生長抑制劑或化學治療劑。在其他實施例中，本發明提供用於抑制異常血管生成及/或血管滲透性或滲漏之抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體。在某些實施例中，本發明提供用於抑制個體異常血管生成及/或血管滲透性或滲漏之方法中的抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體，該方法包含向該個體投與有效之抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體來抑制異常血管生成及/或血管滲透性或滲漏。根據任何上述實施例之「個體」較佳為人類。

在另一態樣中，本發明提供抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體用於製造或製備藥物的用途。在一實施例中，藥物係用於治療涉及異常血管生成及/或血管滲透性或滲漏之疾病或病症。在另一實施例中，藥物係用於治療涉及異常血管生成及/或血管滲透性或滲漏之疾病或病症的方法中，該方法包含向患有

[ S ]

涉及異常血管生成及/或血管滲透性或滲漏之疾病或病症的個體投與有效量之藥物。在一個此實施例中，方法進一步包含向個體投與有效量之至少一種、兩種、三種、四種或四種以上額外治療劑，包括例如如本文中所述之抗血管生成劑、抗贅生劑、生長抑制劑或化學治療劑。在另一實施例中，藥物係用於抑制異常血管生成及/或血管滲透性或滲漏。在另一實施例中，藥物係用於抑制個體異常血管生成及/或血管滲透性或滲漏之方法中，該方法包含向個體投與有效量之藥物以抑制異常血管生成及/或血管滲透性或滲漏。根據任何上述實施例之「個體」可為人類。

在另一態樣中，本發明提供治療涉及異常血管生成及/或血管滲透性或滲漏之疾病或病症的方法。在一實施例中，方法包含向患有涉及異常血管生成及/或血管滲透性或滲漏之此疾病或病症之個體投與有效量之抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體。在一個此實施例中，方法進一步包含向個體投與有效量之至少一種如下所述之額外治療劑。根據任何上述實施例之「個體」可為人類。

在另一態樣中，本發明提供抑制個體異常血管生成及/或血管滲透性或滲漏之方法。在一實施例中，方法包含向個體投與有效量之抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體以抑制異常血管生成及/或血管滲透性或滲漏。在一實施例中，「個體」為人類。

在另一態樣中，本發明提供例如用於任何上述治療方法中的包含任何本文中所提供之抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體之醫藥調配物。在一實施例中，醫藥調配物包含任何本文中所提供之

抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體及醫藥學上可接受之載劑。在另一實施例中，醫藥調配物包含任何本文中所提供之抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體及至少一種例如本文中所述之額外治療劑。

本文中所述之組合療法涵蓋組合投與(其中兩種、三種、四種或四種以上治療劑包括於同一或各別調配物中)及分別投與，在分別投與之情況下，可在投與額外治療劑及/或佐劑之前、同時及/或之後投與本發明之抗體。本發明之抗體亦可與放射療法組合使用。

在某些實施例中，額外治療劑為VEGF拮抗劑(例如抗-VEGF抗體，諸如貝伐單抗)。在一些實施例中，抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體係與VEGF拮抗劑組合投與。抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體及額外藥劑(例如VEGF拮抗劑)可同時或依序投與。或者，可用VEGF拮抗劑治療個體且隨後投與 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗劑，例如用VEGF拮抗劑治療直至個體對VEGF拮抗劑治療無反應且隨後用 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗劑治療個體。根據一實施例，當癌症為未侵襲性時用VEGF拮抗劑治療個體，且隨後當癌症為侵襲性時用 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗劑治療個體。相較未患病患者或對照者，經歷 $\alpha 5\beta 1$ 含量自然升高或回應VEGF拮抗劑療法而升高之一些患者可尤其對此組合治療有反應。涵蓋進一步包含治療劑(例如抗贅生劑、化學治療劑、生長抑制劑及細胞毒性劑)之組合。舉例而言，欲用化學療法(例如伊立替康)及 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗劑治療或已用化學療法及 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗劑治療之患者可受益於VEGF拮抗劑療法。或者，已用化學療法及VEGF拮抗劑治療之患者可受益於 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗劑療法。在一實施例中，

[ S ]

抗-VEGF抗體為貝伐單抗。在另一實施例中，抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體為本文中所述之抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體。

本發明之抗體(及任何額外治療劑)可藉由任何適合方式(包括非經腸、肺內及鼻內)投與，且若需要局部治療，則為病灶內投與。非經腸輸注包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投與。在一定程度上視投藥為短期或長期性而定，可藉由任何適合途徑(例如藉由注射，諸如靜脈內或皮下注射)給藥。本文中涵蓋各種給藥時程，包括(但不限於)單次投與或在多個時間點多次投與、快速投與及脈衝輸注。

本發明之抗體將以符合良好醫學實踐之方式調配、給藥及投與。在此上下文中考慮之因素包括所治療之特定病症、所治療之特定哺乳動物、個別患者之臨床病狀、病症之起因、藥劑之傳遞部位、投藥方法、投藥時程及醫學專業人員已知之其他因素。抗體無需但可視情況與一或多種當前用於預防或治療所述病症之藥劑一起調配。此等其他藥劑之有效量視調配物中存在之抗體量、病症或治療之類型及上文所討論之其他因素而定。此等藥劑一般以與本文中所述相同之劑量及投藥途徑使用，或以本文中所述劑量之約1%至99%使用，或以根據經驗/臨床上確定為適當的任何劑量且任何途徑使用。

為預防或治療疾病，本發明抗體(當單獨使用或與一或多種其他額外治療劑組合使用時)之適當劑量將視以下因素而定：欲治療疾病之類型、抗體類型、疾病之嚴重度及

病程、抗體是否為預防性或治療性目的而投與、先前療法、患者之臨床病史及對抗體之反應、及主治醫師之判斷。抗體適於一次性或經一系列治療投與至患者。視疾病之類型及嚴重度而定，無論例如藉由一或多次各別投與，或藉由連續輸注，向患者投與抗體之初始候選劑量可為約 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  至 15  $\text{mg}/\text{kg}$  (例如 0.1  $\text{mg}/\text{kg}$ -10  $\text{mg}/\text{kg}$ )。視上文所提及之因素而定，一種典型日劑量可在約 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  至 100  $\text{mg}/\text{kg}$  或 100  $\text{mg}/\text{kg}$  以上之範圍內。對於歷經數天或更長時間重複投藥，治療視病狀而定一般將持續至疾病症狀出現所需抑制。抗體之一例示性劑量在約 0.05  $\text{mg}/\text{kg}$  至約 10  $\text{mg}/\text{kg}$  範圍內。因此，可向患者投與約 0.5  $\text{mg}/\text{kg}$ 、2.0  $\text{mg}/\text{kg}$ 、4.0  $\text{mg}/\text{kg}$  或 10  $\text{mg}/\text{kg}$  (或其任何組合) 之一或多種劑量。此等劑量可間歇地投與，例如每週一次或每三週一次 (例如以使得患者接受約 2 至約 20、或例如約 6 個劑量之抗體)。最初可投與較高負載劑量，接著可投與一或多個較低劑量。然而，其他給藥方案可能適用。此療法之進程易於由習知技術及檢定監測。

視欲治療適應症及熟習此項技術之醫師所熟知之給藥相關因素而定，本發明抗體將以可有效治療彼適應症、同時使毒性及副作用降至最低之劑量投與。

可藉由例如 (但不限於) 腫瘤消退、腫瘤重量或尺寸縮減、進展時間、存活持續時間、無進展存活、總反應速率、反應持續時間、生活品質、蛋白質表現及/或活性來評估癌症治療。因為本文中所述之抗血管生成劑靶向腫瘤



血管結構而不一定靶向贅生性細胞本身，所以其代表一種獨特種類之抗癌藥，且因此可能需要對藥物臨床反應的獨特量度及定義。舉例而言，在二維分析中50%以上之腫瘤縮減為表明反應之標準截止點。然而，本發明之 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗劑及VEGF拮抗劑可抑制轉移性擴散而不使原發腫瘤縮減，或可簡單地發揮腫瘤抑制作用。因此，可採用測定療法功效之方法，包括例如量測血管生成之血漿或尿標誌及經由放射成像量測反應。

對於年齡相關之黃斑部變性(AMD)之治療的評估包括(但不限於)視力進一步損失速率之降低或防止視力進一步損失。關於AMD療法，可例如藉由一或多種以下方法量測活體內功效：評定至所需時間時最佳矯正視覺敏銳度(best corrected visual acuity; BCVA)相較於基線之平均變化；評定在所需時間時與基線相比視覺敏銳度失去少於15個字母之個體的比例；評定在所需時間時與基線相比視覺敏銳度獲得大於或等於15個字母之個體的比例；評定在所需時間時具有史奈倫等效值(Snellen equivalent)為20/2000或更差之視覺敏銳度之個體的比例；評定NEI視覺功能問卷(Visual Functioning Questionnaire)；評定在所需時間時CNV之尺寸及CNV之滲漏量(如由螢光素血管攝影術所評定)；及其類似方法。

#### V. 醫藥調配物

抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體可與適合載劑或賦形劑一起調配以使其適於投與。藉由將具有所需純度之抗體與視情況選用之醫藥



學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑 (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第16版, Osol, A.編(1980))混合而獲得呈凍乾調配物或水溶液形式的適合抗體調配物。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對接受者無毒，且包括：緩衝液，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如氯化十八烷基二甲基苄銨；氯化六羥季銨；氯苄烷銨、苄索氯銨；苯酚、丁醇或苄醇；對羥基苯甲酸烷酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(少於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、二醣及其他醣類，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖類，諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉離子；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子界面活性劑，諸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。例示性抗體調配物於WO 98/56418中描述，其係以引用的方式明確併入本文中。本文中之例示性醫藥學上可接受之載劑進一步包括藥物間質分散劑，諸如可溶性中性-活性玻尿酸酶醣蛋白(sHASEGP)，例如人類可溶性PH-20玻尿酸酶醣蛋白，諸如 rHuPH20(HYLENEX®，Baxter International, Inc.)。某些例示性sHASEGP及使用方法(包括rHuPH20)於

[ S ]

美國專利公開案第 2005/0260186 號及第 2006/0104968 號中描述。在一態樣中，sHASEGP 係與一或多種其他葡糖胺聚糖酶(諸如軟骨素酶)組合。適於皮下投與之凍乾調配物於 WO 97/04801 中描述。此等凍乾調配物可以適合稀釋劑復原至高蛋白質濃度，且該復原調配物可經皮下投與至本文中欲治療之哺乳動物。

本文中之調配物亦可視所治療之特定適應症之需要含有一種以上活性化合物，較佳為彼等具有不會彼此不利影響之補充活性之化合物。舉例而言，可能需要進一步提供抗贅生劑、生長抑制劑、細胞毒性劑及/或化學治療劑。此等分子適當地以有效達成預期目的之量以組合形式存在。此等其他藥劑之有效量視調配物中存在之抗體量、疾病或病症或治療之類型及上文所討論之其他因素而定。其一般以與本文中所述相同之劑量及投藥途徑使用或以迄今所用劑量之約 1% 至 99% 使用。

亦可將活性成分截留於例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合所製備之微囊(例如分別為羥甲基纖維素或明膠微囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊)中、膠狀藥物傳遞系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米囊)中或巨乳液中。此等技術揭示於 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第 16 版, Osol, A. 編(1980) 中。

可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之適合實例包括含有拮抗劑之固體疏水性聚合物之半滲透基質，該等基質呈成形物品(例如薄膜或微囊)形式。持續釋放基質之實例包

括聚酯、水凝膠(例如聚(2-羥乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸交酯(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸與乙基-L-麩胺酸酯之共聚物、不可降解之乙烯-乙酸乙烯酯、可降解之乳酸-乙醇酸共聚物(諸如 LUPRON DEPOT™, 由乳酸-乙醇酸共聚物與乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)組成之可注射微球體)、及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。

可使用微脂體(Lipofectin)或脂質體將本發明之多肽及抗體或組合物傳遞至細胞中。若使用抗體片段,則特異性結合至靶蛋白之結合域的最小抑制片段較佳。舉例而言,基於抗體之可變區序列,可設計保持結合靶蛋白序列能力之肽分子。此等肽可化學合成及/或藉由重組DNA技術產生。參見例如 Marasco 等人, *PNAS USA*, 90: 7889-7893 (1993)。

亦可將活性成分截留於例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合所製備之微囊(例如分別為羥甲基纖維素或明膠微囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊)中、膠狀藥物傳遞系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米囊劑)中或巨乳液中。此等技術揭示於 Remington's PHARMACEUTICAL SCIENCES, 同上中。

可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之適合實例包括含有抗體之固體疏水性聚合物之半滲透基質,該等基質呈成形物品(例如薄膜或微囊)形式。持續釋放基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如聚(2-羥乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯

[ S ]

醇))、聚乳酸交酯(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸與 $\gamma$ 乙基-L-麩胺酸酯之共聚物、不可降解之乙烯-乙酸乙烯酯、可降解之乳酸-乙醇酸共聚物(諸如LUPRON DEPOT™, 由乳酸-乙醇酸共聚物與乙酸亮丙瑞林組成之可注射微球體)、及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。儘管諸如乙烯-乙酸乙烯酯及乳酸-乙醇酸之聚合物使分子能夠釋放100天以上,但某些水凝膠釋放蛋白質持續較短時段。當囊封抗體長時間保留於體內時,其可能由於在37°C下暴露於水分中而變性或聚集,從而導致生物活性損失及可能之免疫原性變化。視所涉及之機制而定,可設計合理策略以達成穩定化。舉例而言,若發現聚集機制為經由硫基-二硫化物互換形成分子間S-S鍵,則可藉由修飾氫硫基殘基、自酸性溶液凍乾、控制含水量、使用適當添加劑及開發特定聚合物基質組合物來達成穩定化。

欲用於活體內投與之調配物必須無菌。此可藉由通過無菌過濾膜進行過濾而輕易地實現。

## VI. 使用抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體之診斷及成像方法

特異性結合至 $\alpha 5\beta 1$ 多肽之經標記抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體及其衍生物及類似物可用於診斷目的以偵測、診斷或監測與 $\alpha 5\beta 1$ 之表現、異常表現及/或活性相關的疾病及/或病症。舉例而言,本發明之抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體可用於原位、活體內、離體及活體外診斷檢定或成像檢定中。

偵測 $\alpha 5\beta 1$ 多肽之表現的方法包含(a)使用一或多種本發明抗體檢定個體之細胞(例如組織)或體液中的多肽表現,及

(b)比較基因表現量與標準基因表現量，其中用經檢定基因表現量相較於標準表現量之增加或降低指示異常表現。

本發明之其他實施例包括診斷動物(例如諸如人類之哺乳動物)之與 $\alpha 5\beta 1$ 表現或異常表現相關之疾病或病症的方法。該等方法包含偵測哺乳動物體內之 $\alpha 5\beta 1$ 分子。在一實施例中，在投與VEGF拮抗劑後，診斷包含：(a)向哺乳動物投與有效量之經標記抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體；(b)在投藥後等待一段時間間隔以允許經標記 $\alpha 5\beta 1$ 抗體優先集中於個體體內表現 $\alpha 5\beta 1$ 分子之部位(且將未經結合經標記分子清除至本底含量)；(c)測定本底含量；及(d)偵測個體體內之經標記分子，以使得偵測到經標記分子高於本底含量指示該個體患有與 $\alpha 5\beta 1$ 表現或異常表現相關之特定疾病或病症。可藉由多種方法測定本底含量，包括比較所偵測之經標記分子量與先前針對特定系統所測定之標準值。

本發明之抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體可用於使用熟習此項技術者已知之經典免疫組織學方法(例如參見Jalkanen等人, *J. Cell. Biol.* 101:976-985 (1985); Jalkanen等人, *J. Cell. Biol.* 105:3087-3096 (1987))來檢定生物樣品中之蛋白質含量。適用於偵測蛋白質基因表現之其他基於抗體之方法包括免疫檢定，諸如酶聯結免疫吸附劑檢定(ELISA)及放射性免疫檢定(RIA)。適合的抗體檢定標記物在此項技術中已知且包括：酶標記物，諸如葡萄糖氧化酶；放射性同位素，諸如碘( $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ )、碳( $^{14}\text{C}$ )、硫( $^{35}\text{S}$ )、氫( $^3\text{H}$ )、銦( $^{115\text{m}}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ )、及鎝( $^{99}\text{Tc}$ 、

[ S ]

$^{99m}\text{Tc}$ )、鈦 ( $^{201}\text{Ti}$ )、鎳 ( $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ )、鈀 ( $^{103}\text{Pd}$ )、鉬 ( $^{99}\text{Mo}$ )、氙 ( $^{133}\text{Xe}$ )、氟 ( $^{18}\text{F}$ )、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{140}\text{La}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ ；魯米諾(luminol)；及螢光標記物，諸如螢光素及若丹明(rhodamine)，及生物素。

可對本發明之經標記抗體應用此項技術中已知之技術。此等技術包括(但不限於)使用雙功能結合劑(參見例如美國專利第5,756,065號；第5,714,631號；第5,696,239號；第5,652,361號；第5,505,931號；第5,489,425號；第5,435,990號；第5,428,139號；第5,342,604號；第5,274,119號；第4,994,560號；及第5,808,003號)。

根據一特定實施例，在投與VEGF拮抗劑治療劑之後在診斷或預後檢定中藉由評估細胞表面上存在之 $\alpha 5\beta 1$ 之含量(例如經由使用抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體之免疫組織化學檢定)來測定 $\alpha 5\beta 1$ 多肽表現或過度表現。或者或另外，可例如經由使用對應於編碼 $\alpha 5\beta 1$ 之核酸或其補體之基於核酸的探針之螢光原位雜交(FISH；參見1998年10月公開之WO 98/45479)、南方墨點法(Southern blotting)、北方墨點法(Northern blotting)或聚合酶鏈反應(PCR)技術(諸如即時定量PCR(RT-PCR))來量測細胞中編碼 $\alpha 5\beta 1$ 多肽之核酸或mRNA的含量。亦可例如使用基於抗體之檢定藉由量測生物流體(諸如血清)中之shed抗原來研究 $\alpha 5\beta 1$ 過度表現(亦參見例如1990年6月12日頒予之美國專利第4,933,294號；1991年4月18日公開之WO 91/05264；1995年3月28日頒予之美國專利

5,401,638；及 Sias 等人，*J. Immunol. Methods* 132:73-80 (1990)。除上述檢定以外，熟練專業人員亦可利用多種活體內及離體檢定。舉例而言，可將哺乳動物體內之細胞暴露於視情況經可偵測標記物(例如放射性同位素)標記之抗體，且可例如藉由外部掃描放射性或藉由分析自先前暴露於抗體之哺乳動物獲取之樣品(例如活組織檢查或其他生物樣品)來評估抗體之結合。

## VII. 製品及套組

本發明之另一實施例為含有適用於治療癌症(例如腫瘤)、眼疾病(例如濕性AMD)或自體免疫疾病及相關病狀之物質的製品。該製品可包含容器及在該容器上或與該容器相聯之標籤或藥品說明書。適合之容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可由諸如玻璃或塑膠之各種材料形成。一般而言，容器容納可有效治療病狀之組合物且可具有無菌出口孔(例如容器可為具有可由皮下注射針刺穿之塞子的靜脈內溶液袋或小瓶)。組合物中之至少一種活性劑為本發明之VEGF拮抗劑或 $\alpha 5\beta 1$ 拮抗劑或VEGF促效劑或 $\alpha 5\beta 1$ 促效劑。標籤或藥品說明書指示該組合物係用於治療特定病狀。標籤或藥品說明書將進一步包含針對向患者投與抗體組合物之說明書。亦涵蓋包含本文中所述之組合療法之製品及套組。

藥品說明書係指通常包括於治療產品之商業包裝內的說明書，其含有關於使用此等治療產品之適應症、用法、劑量、投藥、禁忌症及/或警告的資訊。

[ S ]



另外，製品可進一步包含第二容器，該容器包含醫藥學上可接受之緩衝液，諸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液。其可進一步包括根據商業及使用者觀點所需之其他物質，包括其他緩衝液、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

亦提供視情況與製品組合適用於各種目的(例如用於分離或偵測患者體內之 $\alpha 5 \beta 1$ 及/或VEGF)之套組。為分離及純化 $\alpha 5 \beta 1$ ，套組可含有抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗體與珠粒(例如瓊脂糖珠粒)偶合。可提供含有活體外(例如在ELISA或西方墨點法中)偵測及定量 $\alpha 5 \beta 1$ 及/或VEGF之抗體的套組。如同製品一樣，套組包含容器及在該容器上或與該容器相聯之標籤或藥品說明書。舉例而言，容器容納包含至少一種本發明之抗- $\alpha 5 \beta 1$ 抗體的組合物。可包括含有例如稀釋劑及緩衝液、對照抗體之其他容器。標籤或藥品說明書可提供關於組合物之描述以及用於所希望之活體外或診斷用途之說明書。

除非說明為其他，否則實例中所提及之市售試劑係根據製造商之說明書使用。在以下實例及整個說明書中由ATCC寄存編號鑑別之彼等細胞來源為美國菌種保存中心(Manassas, VA)。除非說明為其他，否則本發明使用重組DNA技術之標準程序，諸如上文及以下教科書中所述之彼等：Sambrook等人，同上；Ausubel等人，CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.,

1989) ; Innis 等人 , PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS (Academic Press, Inc.: N.Y., 1990) ; Harlow 等人 , ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, 1988) ; Gait, OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (IRL Press: Oxford, 1984) ; Freshney, ANIMAL CELL CULTURE, 1987 ; Coligan 等人 , CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, 1991 。

### 實例

提供以下實例來說明而非限制所主張之本發明。熟習此項技術者將輕易地認識到多種非關鍵參數可經改變或修改以得到基本上相同之結果。

#### 實例1：材料及方法

##### A. BIAcore分析：

為測定本文中所述抗體之結合動力學及親和力，使用利用 BIAcore™-3000 儀器進行之表面電漿共振 (SRP) 量測。首先藉由不同流槽 (flow cell) 上之預固定兔抗-人類 Fc CM5 生物感測晶片捕捉抗體以達到大約 150 RU (回應單位)。為進行動力學量測，在 25°C 下以 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  之流動速率將 2 倍連續稀釋之人類整合素  $\alpha 5\beta 1$  (300 nM 至 1.2 nM) 注入 PBT 緩衝液 (含有 0.05% Tween 20 之 PBS) 中。使用簡單一對一朗繆耳結合模型 (BIAcore 評估軟體 3.2 版) 計算締合速率 ( $k_{\text{on}}$ ) 及解離速率 ( $k_{\text{off}}$ )。以比率  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  之形式來計算平衡解離常數 ( $K_{\text{D}}$ )。

### B. U937細胞之纖維結合蛋白結合檢定

將100  $\mu$ l以PBS(pH 7.4)稀釋之10  $\mu$ g/ml纖維結合蛋白(R & D Systems)添加至96孔培養盤(Nucn MaxiSorp)之孔中且在2-8 $^{\circ}$ C下培育隔夜。以200  $\mu$ L PBS(pH 7.4)洗滌培養盤3次。向所有孔中添加200  $\mu$ l PBS(pH 7.4)/1% BSA且在室溫下在輕微攪動下培育培養盤至少60分鐘。以200  $\mu$ L PBS(pH 7.4)洗滌培養盤3次。

將50  $\mu$ l經稀釋抗- $\alpha$ 5 $\beta$ 1抗體添加至各孔中(10  $\mu$ g/mL，以1:3連續稀釋10次)，接著立即添加50  $\mu$ l含濃度為每毫升 $1 \times 10^6$ 個細胞之U937細胞(ATCC，目錄號CRL-1593.2)之檢定培養基(RPMI 1640(Media Prep A0806)、5 mg/mL BSA、1 mM L-麩醯胺酸、1 mM MgCl<sub>2</sub>)。

在37 $^{\circ}$ C下培育培養盤30分鐘，丟棄未結合之細胞且以150  $\mu$ L檢定培養基洗滌培養盤兩次。向各孔中添加100  $\mu$ l檢定培養基及100  $\mu$ l Cell-Titer Glow(Promega目錄號G7573)。在室溫下培育培養盤10-15分鐘，將其覆蓋。利用VICTOR<sup>2</sup>V(Perkin-Elmer)培養盤讀取器偵測發光，且使用四參數非線性最小平方擬合分析相對於檢定中所用抗體濃度的發光單位，以獲得IC<sub>50</sub>值。

### C. $\alpha$ 5 $\beta$ 1之纖維結合蛋白結合檢定

將25  $\mu$ l以PBS稀釋之1  $\mu$ g/ml纖維結合蛋白(R & D Systems)添加至384孔培養盤(Nucn MaxiSorp)之孔中且在2-8 $^{\circ}$ C下培育隔夜。以80  $\mu$ L PBT緩衝液洗滌培養盤3次。向所有孔中添加50  $\mu$ l PBS/1% BSA，在室溫下在輕微攪動

下培育培養盤至少60分鐘，隨後以80  $\mu$ L PBT緩衝液洗滌3次。

將抗- $\alpha$ 5 $\beta$ 1抗體(30  $\mu$ g/mL)以1:3連續稀釋11次。向0.65 mL微管中添加50  $\mu$ l連續稀釋之抗- $\alpha$ 5 $\beta$ 1抗體且在室溫下在輕微攪動下與50  $\mu$ L含200 ng/mL  $\alpha$ 5 $\beta$ 1(R & D Systems)之ELISA緩衝液(150 mM NaCl、10 mM Tris(pH 7.5)、5 mg/mL BSA、1 mM MnCl<sub>2</sub>)預混合(1:1)60分鐘。將25  $\mu$ L預混合之 $\alpha$ 5 $\beta$ 1及抗- $\alpha$ 5 $\beta$ 1抗體添加至經纖維結合蛋白塗布之孔中且在室溫下在輕微攪動下培育培養盤60分鐘。以PBT緩衝液洗滌培養盤6次，將含100 ng/mL抗- $\beta$ 1-生物素之ELISA緩衝液添加至各孔中且在室溫下在輕微攪動下培育培養盤60分鐘。以80  $\mu$ L PBT緩衝液洗滌培養盤6次，向各孔中添加25  $\mu$ L 抗生蛋白鏈菌素(Streptavidin)-HRP(於ELISA緩衝液中1:50,000，GE Healthcare)，且在室溫下在輕微攪動下培育培養盤60分鐘。以80  $\mu$ L PBT緩衝液洗滌培養盤6次，向各孔中添加25  $\mu$ L TMB受質(Kirkgaard and Perry Laboratories)，在室溫下培育培養盤約6分鐘，且以25  $\mu$ L之1 M磷酸終止反應。在450 nm下讀取吸光度且按照上文B部分中所述分析IC<sub>50</sub>值。

#### D. HUVEC遷移檢定

使HUVEC細胞在標準培養基中生長至80%匯合。以胰蛋白酶處理細胞，對其計數，且使其以每毫升 $5 \times 10^5$ 個細胞之濃度再懸浮於含有0.1% BSA之EBM-2培養基中。為進行檢定，將100  $\mu$ l細胞(每孔 $5 \times 10^4$ 個細胞)塗於24孔BD Falcon

HTS多孔系統(BD Ref: 351185, 孔徑8  $\mu\text{m}$ )之各孔中。以纖維結合蛋白(1-2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )預先塗布HTS培養盤隔夜。以PBS洗滌培養盤且向底部腔室中添加500  $\mu\text{l}$ (含有0.1% BSA之EBM)溶液。各樣品使用3-6個孔。不向陰性對照孔中添加遷移刺激物(例如VEGF)。

為開始檢定, 將100  $\mu\text{l}$ 細胞(每孔 $5 \times 10^4$ 個細胞)添加至上部腔室中。下部腔室含有500  $\mu\text{l}$ 培養基(含有0.1% BSA之EBM)。在將遷移刺激物(VEGF)添加至下部腔室中之前, 一般向上部腔室中添加抗-整合素 $\alpha 5\beta 1$ 抗體及同型對照物, 使得細胞最終濃度為0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 且培育15分鐘。

將刺激物添加至下部腔室中(10  $\text{ng}/\text{ml}$  VEGF-A), 且培育培養盤4-6小時或隔夜。使用海綿刷自上部腔室擦除細胞, 添加PBS, 隨後再次自上部腔室擦除細胞。自下部腔室排出培養基且以500  $\mu\text{l}$  100%甲醇將細胞固定5分鐘。

隨後以500  $\mu\text{l}$  SYTOX®綠核酸染色劑(用PBS以1:5000或1:10000稀釋)(Molecular Probes S7020)將細胞染色至少10分鐘(在黑暗中)。隨後, 使用顯微鏡獲取各孔之個別照片。使用AxioVision AC程式及5倍物鏡獲取照片。

使用ImageJ分析結果(最小5個像素, bin 5)。記錄每孔之細胞數目且使用Microsoft Excel分析。

## 實例2: 抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體之產生

藉由用重組人類 $\alpha 5\beta 1$ 細胞外域多肽使倉鼠免疫來產生抗 $\alpha 5\beta 1$ 抗體。選擇包含圖1及圖2中所述之VH及VL序列的倉

鼠單株抗體純系 18C12。

藉由將來自倉鼠 18C12 之輕鏈選殖至兩個共同 VL<sub>kappa1</sub>/VH<sub>III</sub> 構架 h18C12.v1.1 及 h18C12.v2.1 (其僅 CDR-H3 接觸區不同) 中來產生兩種形式之嵌合倉鼠 18C12 (h18C12.v1.1 及 h18C12.v2.1)。特定言之，h18C12.v1.1 之 CDR-H3 接觸區包含以下殘基：C<sup>92</sup>A<sup>93</sup>R<sup>94</sup>，且 h18C12.v2.1 之 CDR-H3 接觸區包含以下殘基：C<sup>92</sup>T<sup>93</sup>S<sup>94</sup>。h18C12.v1.1 與 h18C12.v2.1 均成功地以 Fab 格式呈現於噬菌體上且藉由噬菌體競爭 ELISA 觀測結合。觀測到 h18C12.v1.1 與 h18C12.v2.1 之間在結合方面無顯著差異。選擇 h18C12.v1.1 進行進一步人類化。藉由將 h18C12.v1.1 之大多數輕鏈構架變成人類共同 λ IV 構架 (除輕鏈中之以下殘基以外：Y36、A43 及 Y49) 而產生人類化 18C12.v3。另外，保留人類 VH<sub>III</sub> 構架中之以下殘基：G49 及 D73。

h18C12.v3 經親和力成熟且產生以下純系：h18C12.v6；h18C12.v7；h18C12.v9；h18C12.v15；h18C12.v16；h18C12.v28；h18C12.v30；h18C12.v51；h18C12.v54；h18C12.v70；h18C12.v78。各純系之 CDR 序列於圖 3 中闡述。h18C12.v6 純系之 CDR 序列經如下修飾：CDR-L2: D50cS 及 D56S；CDR-H1: N31A；及 CDR-H2: N53A。隨後將經修飾 CDR 序列插入經修飾人類 λIII//VHIII 構架中以產生 h18C12.v6.1Lam3 (h18C12.v6.1) 及 h18C12.v6.2Lam3 (h18C12.v6.2)。h18C12.v6.1 之經修飾人類 λIII 構架含有以下修飾：L46Y；V47L；I48M；N69A；A71R；及 G77N。

[ S ]

h18C12.v6.2之經修飾人類 $\lambda$ III構架含有以下修飾：N69A；A71R；及G77N。經修飾VHIII構架含有以下修飾：S49G及N73D。

純系 h18C12.v6.1 經進一步修飾以移除 CDR-L2 ( $N^{50a}S^{50b}S^{50c}G^{50d}$ ) 中之天冬醯胺(N)。產生以下純系：h18C12.v6.1.1；h18C12.v6.1.2；h18C12.v6.1.3；h18C12.v6.1.4；及 h18C12.v6.1.5。各 h18C12.v6.1 純系之位置 50a、50b、50c及 50d 處之 CDR-L2 序列於圖 7 中闡述。

### 實例 3：噬菌體競爭 ELISA

將 MAXISORP™ 微量滴定盤以 5  $\mu$ g/ml 含重組人類整合素  $\alpha 5\beta 1$  (R&D) 之 PBS 塗布隔夜且隨後在室溫下以 PBST 緩衝液 (含 0.5% BSA 及 0.05% Tween 20 之 PBS) 阻斷一小時。將來自培養物上清液之噬菌體與以 PBST 緩衝液連續稀釋之人類整合素  $\alpha 5\beta 1$  一起於組織培養微量滴定盤中培育 1 小時，其後將 80  $\mu$ l 混合物轉移至標靶塗布孔中歷時 15 分鐘來捕捉未經結合之噬菌體。以 PBT 緩衝液 (含 0.05% Tween 20 之 PBS) 洗滌培養盤，且添加 HRP 結合之抗 M13 (Amersham Pharmacia Biotech) (於 PBST 緩衝液中 1:5000) 歷時 40 分鐘。以 PBT 緩衝液洗滌培養盤且藉由添加四甲基聯苯胺受質 (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) 顯影。繪製 450 nm 下之吸光度隨溶液中標靶濃度而變化之函數來測定噬菌體  $IC_{50}$ 。其用作對噬菌體表面上呈現之 Fab 純系之親和力估算值。圖 4 描繪噬菌體競爭檢定之結果，其顯示親和力成熟 18C12 變異體 h18C12.v3、h18C12.v6、

h18C12.v7、h18C12.v9、h18C12.v15、h18C12.v16、h18C12.v28、h18C12.v30、h18C12.v51、h18C12.v54、h18C12.v70及h18C12.v78與人類 $\alpha 5\beta 1$ 整合素的結合。

#### 實例4：藉由BIAcore進行之抗體親和力測定

為測定嵌合18C12、h18C12.v6.1、h18C12.v6.1.1、h18C12.v6.1.2、h18C12.v6.1.3、h18C12.v6.1.4、h18C12.v6.1.5 IgG之結合動力學及親和力，使用如實例1中所述利用BIAcore™-3000儀器進行之表面電漿共振(SRP)量測。

圖5描繪對親和力成熟18C12變異體與人類 $\alpha 5\beta 1$ 整合素之結合之BIAcore分析的結果。圖6描繪對嵌合18C12(包含圖1中所述之倉鼠VL及VH序列及IgG1之Fc部分的18C12)及h18C12.v6.1與人類 $\alpha 5\beta 1$ 整合素之結合之BIAcore分析的結果。資料表明h18C12.v6.1對人類 $\alpha 5\beta 1$ 整合素之結合親和力為倉鼠18C12對人類 $\alpha 5\beta 1$ 整合素之結合親和力的大約2倍。圖7描繪各h18C12.v6.1純系之BIAcore分析的結果。

#### 實例5：18C12抗體抑制與纖維結合蛋白之結合

為比較嵌合18C12與h18C12.v6.1或h18C12.v6.1.5 IgG對於與纖維結合蛋白結合之作用，使用上文實例1中所述之纖維結合蛋白結合檢定。

圖8描繪比較嵌合18C12與h18C12.v6.1在干擾U937細胞與纖維結合蛋白結合方面之能力之纖維結合蛋白結合檢定的結果。圖9描繪比較倉鼠18C12與h18C12.v6.1.5在干擾U937細胞與纖維結合蛋白結合方面之能力之纖維結合蛋白

[ S ]



結合檢定的結果。圖 10 描繪比較倉鼠 18C12 與 h18C12.v6.1.5 在干擾重組  $\alpha_5\beta_1$  細胞外域與纖維結合蛋白結合方面之能力之纖維結合蛋白結合檢定的結果。資料表明倉鼠 18C12、嵌合 18C12、h18C12.v6.1 及 h18C12.v6.1.5 抑制 U937 細胞或重組  $\alpha_5\beta_1$  細胞外域與纖維結合蛋白之結合。

#### 實例 6：18C12 抗體抑制 HUVEC 遷移

為比較嵌合 18C12 與 h18C12.v6.1 IgG 對於 HUVEC 細胞遷移之作用，使用上文實例 1 中所述之 HUVEC 遷移檢定。

圖 11 描繪比較嵌合 18C12 與 h18C12.v6.1 在干擾 HUVEC 細胞於纖維結合蛋白上遷移方面之能力之 HUVEC 遷移檢定的結果。資料表明嵌合 18C12 及 h18C12.v6.1 抑制 HUVEC 細胞於纖維結合蛋白上之遷移。

#### 實例 7：胚胎發育檢定

在胚胎發育檢定中使用表現嵌合  $\alpha_5\beta_1$  整合素(人類  $\alpha_5$  及鼠類  $\beta_1$ )之  $\alpha_5$  轉殖基因小鼠來證明本文中所述之 18C12 抗體的功效。使表現人類  $\alpha_5$  且不表現鼠類  $\alpha_5$  之雄性轉殖基因小鼠與不表現人類  $\alpha_5$  及鼠類  $\alpha_5$  之異型接合子之雌性小鼠交配。在交配後第 9.5 天開始每週兩次向懷孕小鼠腹膜內注射 10 mg/kg 抗- $\alpha_5\beta_1$  抗體(h18C12.v6.1.5)或陰性對照抗體。在交配後第 14.5 天，採集胚胎，基因定型，且評估胚胎血管結構。結果於下表中概述。

處理	整合素 $\alpha_5$ 表現	血管發育
h18C12.v6.1.5	僅人類 $\alpha_5$	出血、發育遲緩及廣泛性全身性水腫
h18C12.v6.1.5	僅鼠類 $\alpha_5$	正常
陰性對照抗體	僅人類 $\alpha_5$	正常
陰性對照抗體	僅鼠類 $\alpha_5$	正常

此等結果表明h18C12.v6.1.5在血管發育期間活體內破壞 $\alpha 5\beta 1$ 整合素功能。

#### 實例8：腫瘤同種異體移植檢定

在研究中使用C57/B16同種異體移植腫瘤模型來證明本文中所述18C12抗體之功效。將C57/B16腫瘤細胞植入鼠類 $\alpha 5$ 基因剔除::人類 $\alpha 5$ 轉殖基因小鼠體內且用抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體處理小鼠。

將帶有已確定腫瘤之小鼠隨機分成四組，使得所有組具有類似的初始腫瘤體積。給藥方案如下：

(1)陰性對照抗體(13.5 mg/kg，每週2次)

(2)抗-VEGF抗體(3.5 mg/kg，每週2次)+陰性對照抗體(10 mg/kg，每週2次)

(3)陰性對照抗體(3.5 mg/kg，每週2次)+抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體(18C12)(10 mg/kg，每週2次)

(4)抗-VEGF抗體(3.5 mg/kg，每週2次)+抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體(18C12)(10 mg/kg，每週2次)。

使用測徑規每週兩次量測腫瘤之長度及寬度，且使用此公式計算腫瘤體積：腫瘤體積( $\text{mm}^3$ )= $(w^2 \times l)/2$ ，其中 $w$ =寬度(mm)且 $l$ =長度(mm)。繪製腫瘤體積對時間之曲線以反映腫瘤生長速率。

#### 實例9：腫瘤異種移植檢定

在研究中使用腫瘤異種移植檢定來證明本文中所述18C12抗體之功效。將具有螢光素酶報導基因之人類U87神經膠質瘤細胞植入裸小鼠腦中且用抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體處理小

[ S ]

鼠。

使用生物發光成像使帶有已確立腫瘤之小鼠成像且隨機分成三組，使得所有組具有類似的初始腫瘤負荷。給藥方案如下：

(1)陰性對照抗體(豬草)(5 mg/kg，每週2次)+抗-gD(10 mg/kg，每週2次)

(2)抗-VEGF抗體(B20-4.1)(5 mg/kg，每週2次)+陰性對照抗體抗-gD(10 mg/kg，每週2次)

(3)抗-VEGF抗體(B20-4.1)(5 mg/kg，每週2次)+抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體(h18C12.v6.1.5)(10 mg/kg，每週2次)

在手術植入腫瘤細胞後每日監測此等小鼠之存活。用抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體h18C12.v6.1.5與抗-VEGF組合處理相對於單獨抗-VEGF而言顯著提高小鼠之存活率。結果於圖12中展示。亦在植入後第1週、第3週、第4週及第5週使用生物發光成像量測腫瘤負荷。用抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體h18C12.v6.1.5與抗-VEGF組合處理之小鼠相對於僅用抗-VEGF處理之小鼠腫瘤負荷降低。結果於圖13中展示。

本文中引用之所有公開案(包括例如專利、已公開專利申請案及Genbank寄存編號)係為所有目的以全文引用的方式併入本文中，其引用之程度如同各參考文獻特定地且個別地以引用的方式併入一般。

### 【圖式簡單說明】

圖1A及圖1B描繪以下輕鏈可變域之序列的比對：人類 $\lambda III$ ；倉鼠18C12；嵌合18C12.v.1.1；h18C12.v3；

h18C12.v6 ; h18C12.v6.1.Lam3 ; h18C12.v6.2Lam3 ; 及 h18C12.v6.1.5 。

圖 2A及圖 2B描繪以下重鏈可變域之序列的比對：倉鼠 18C12 ; h18C12.v3 ; h18C12.v6 ; h18C12.v6.1.Lam3 ; h18C12.v6.2Lam3 ; 及 h18C12.v6.1.5 。

圖 3描繪 h18C12.v3 及 h18C12.v3 親和力成熟變異體 h18C12.v6 ; h18C12.v7 ; h18C12.v9 ; h18C12.v15 ; h18C12.v16 ; h18C12.v28 ; h18C12.v30 ; h18C12.v51 ; h18C12.v54 ; h18C12.v70 ; 及 h18C12.v78 之 CDR 序列 。

圖 4描繪展現 h18C12.v3 親本純系及 18C12 親和力成熟變異體 h18C12.v6 ; h18C12.v7 ; h18C12.v9 ; h18C12.v15 ; h18C12.v16 ; h18C12.v28 ; h18C12.v30 ; h18C12.v51 ; h18C12.v54 ; h18C12.v70 ; 及 h18C12.v78 與人類  $\alpha_5\beta_1$  整合素之結合之噬菌體競爭 ELISA 的結果 。

圖 5描繪 h18C12.v3 親本純系及 h18C12.v3 親和力成熟變異體 h18C12.v6 ; h18C12.v15 ; h18C12.v54 ; 及 h18C12.v70 與人類  $\alpha_5\beta_1$  整合素之結合之 BIACORE<sup>®</sup> 分析的結果 。

圖 6描繪嵌合 18C12 及 h18C12.v6.1.Lam3 與人類  $\alpha_5\beta_1$  整合素之結合之 BIACORE<sup>®</sup> 分析的結果 。

圖 7描繪 h18C12.v6.1 純系 h18C12.v6.1.1 、 h18C12.v6.1.2 、 h18C12.v6.1.3 、 h18C12.v6.1.4 及 h18C12.v6.1.5 之結合之 BIACORE<sup>®</sup> 分析的結果且列出各 h18C12.v6.1 純系在位置 50a 、 50b 、 50c 及 50d 處的 CDR-L2 序列 。

圖 8描繪比較嵌合 18C12 與 h18C12.v6.1 在干擾 U937 細胞

[ S ]

與纖維結合蛋白結合方面之能力之纖維結合蛋白結合檢定的結果。

圖9描繪比較倉鼠18C12與h18C12.v6.1.5在干擾U937細胞與纖維結合蛋白結合方面之能力之纖維結合蛋白結合檢定的結果。

圖10描繪比較倉鼠18C12與h18C12.v6.1.5在干擾 $\alpha_5\beta_1$ 與纖維結合蛋白結合方面之能力之纖維結合蛋白結合檢定的結果。

圖11描繪比較嵌合18C12與h18C12.v6.1在干擾HUVEC細胞於纖維結合蛋白上遷移方面之能力之HUVEC遷移檢定的結果。

圖12描繪量測h18C12.v6.1.5 +/-抗-VEGF在增強存活方面之能力之腫瘤異種移植檢定的結果。

圖13描繪量測h18C12.v6.1.5 +/-抗-VEGF在降低腫瘤負荷方面之能力之腫瘤異種移植檢定的結果。

## 序列表

<110>美商建南德克公司

<120>新穎抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體及其用途

<130> P4170R1

<140> 099108558

<141> 2010-03-23

<150> US 61/163, 241

<151> 2009-03-25

<160> 40

<210> 1

<211> 110

<212> PRT

<213> 人類化

<220>

<221> Variant

<222> 22-36

<223> X 為任何胺基酸

<220>

<221> Unsure

<222> 22-36, 52-62, 95-105

<223> 未知胺基酸

<220>

<221> Variant

<222> 52-62

<223> X 為任何胺基酸

<220>

<221> Variant

<222> 95-105

<223> X 為任何胺基酸

<400> 1

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

Thr Val Arg Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 35 40 45

Pro Val Leu Val Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 50 55 60

Xaa Xaa Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn  
 65 70 75

Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala  
 80 85 90

Asp Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 95 100 105

Phe Gly Gly Gly Thr  
 110

<210> 2

<211> 106

<212> PRT

<213> 中國倉鼠

<400> 2

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

Asn Ser Val Lys Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr  
 20 25 30

Tyr Thr Ile Gly Trp Tyr Gln Gln His Pro Asp Lys Ala Pro Lys  
 35 40 45

Tyr Val Met Tyr Leu Asn Ser Asp Gly Ser His Asn Lys Gly Asp  
 50 55 60

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala His Arg  
 65 70 75







&lt;400&gt; 4

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

Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr  
                   20                    25                    30

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

Tyr Leu Met Tyr Leu Asn Ser Asp Gly Ser His Asn Lys Gly Asp  
                   50                    55                    60

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg  
                   65                    70                    75

Tyr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr  
                   80                    85                    90

Tyr Cys Gly Ser Ser Tyr Ser Ser Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly  
                   95                    100                    105

Thr

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人類化

&lt;400&gt; 5

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

Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr  
                   20                    25                    30

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

Tyr Leu Met Tyr Leu Asn Ser Asp Gly Ser His Asn Lys Gly Asp  
                   50                    55                    60



Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg  
 65 70 75

Tyr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr  
 80 85 90

Tyr Cys Ala Ala Tyr Tyr Ala Tyr Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly  
 95 100 105

Thr

<210> 6

<211> 106

<212> PRT

<213> 人類化

<400> 6

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

Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr  
 20 25 30

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

Tyr Leu Met Tyr Leu Asn Ser Ser Gly Ser His Asn Lys Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Thr Arg  
 65 70 75

Ser Leu Thr Ile Thr Asn Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr  
 80 85 90

Tyr Cys Ala Ala Tyr Tyr Ala Tyr Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly  
 95 100 105

Thr

<210> 7

<211> 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人類化

&lt;400&gt; 7

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

Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr  
 20 25 30

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

Leu Val Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Gly Ser His Asn Lys Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Thr Arg  
 65 70 75

Ser Leu Thr Ile Thr Asn Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr  
 80 85 90

Tyr Cys Ala Ala Tyr Tyr Ala Tyr Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly  
 95 100 105

Thr

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人類化

&lt;400&gt; 8

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

Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr  
 20 25 30

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

Tyr Leu Met Tyr Leu Asn Ser Asp Ser Ser His Asn Lys Gly Ser



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

Thr

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 114

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 中國倉鼠

&lt;400&gt; 9

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

<210> 10  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> 人類化

<220>  
 <221> Variant  
 <222> 26-35  
 <223> X 為任何胺基酸

<220>  
 <221> Unsure  
 <222> 26-35, 52-70, 103-111  
 <223> 未知胺基酸

<220>  
 <221> Variant  
 <222> 52-70  
 <223> X 為任何胺基酸

<220>  
 <221> Variant  
 <222> 103-111  
 <223> X 為任何胺基酸

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



Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa  
                           95                          100                          105

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr  
                           110                          115

<210> 11

<211> 114

<212> PRT

<213> 人類化

<400> 11

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

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

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

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

Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
                           65                          70                          75

Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala  
                           80                          85                          90

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Gly Met Arg  
                           95                          100                          105

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                           110

<210> 12

<211> 114

<212> PRT

<213> 人類化

<400> 12

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

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

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

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

Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
 65 70 75

Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala  
 80 85 90

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Gly Met Lys  
 95 100 105

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 110

<210> 13

<211> 114

<212> PRT

<213> 人類化

<400> 13

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

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

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

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

Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
 65 70 75

Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala



80 85 90  
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Gly Met Lys  
 95 100 105

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 110

<210> 14

<211> 114

<212> PRT

<213> 人類化

<400> 14

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

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

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

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

Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
 65 70 75

Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala  
 80 85 90

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Gly Met Lys  
 95 100 105

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 110

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>



<223> 序列係經合成

<220>

<221> Variant

<222> 3

<223> X 為 S 或 T

<220>

<221> Variant

<222> 4

<223> X 為 S、P 或 T

<220>

<221> Variant

<222> 5

<223> X 為 Q 或 N

<220>

<221> Variant

<222> 7

<223> X 為 F 或 S

<220>

<221> Variant

<222> 8

<223> X 為 T 或 I

<220>

<221> Variant

<222> 10

<223> X 為 K 或 T

<220>

<221> Variant

<222> 12

<223> X 為 G、D 或 S

<400> 15

Thr Leu Xaa Xaa Xaa His Xaa Xaa Tyr Xaa Ile Xaa

5

10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT



<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係經合成

<220>

<221> Variant

<222> 1

<223> X 為 L 或 I

<220>

<221> Variant

<222> 2

<223> X 為 N 或 T

<220>

<221> Variant

<222> 4

<223> X 為 D、H 或 S

<220>

<221> Variant

<222> 5

<223> X 為 G 或 S

<220>

<221> Variant

<222> 6

<223> X 為 S、L 或 T

<220>

<221> Variant

<222> 7

<223> X 為 H 或 Y

<220>

<221> Variant

<222> 8

<223> X 為 N、K、Q 或 I

<220>

<221> Variant

<222> 9

<223> X 為 K 或 T



<221> Variant  
 <222> 6  
 <223> X 為 S、Y 或 T

<220>  
 <221> Variant  
 <222> 9  
 <223> X 為 V 或 I

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

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

<220>  
 <223> 序列係經合成

<220>  
 <221> Variant  
 <222> 6  
 <223> X 為 N 或 A

<220>  
 <221> Variant  
 <222> 9  
 <223> X 為 I 或 V

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

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

<220>  
 <223> 序列係經合成

<220>

<221> Variant

<222> 7

<223> X 為 N、A 或 T

<220>

<221> Variant

<222> 8

<223> X 為 I 或 R

<220>

<221> Variant

<222> 12

<223> X 為 E 或 Q

<400> 19

Gly	Ile	Lys	Thr	Lys	Pro	Xaa	Xaa	Tyr	Ala	Thr	Xaa	Tyr	Ala	Asp
1				5					10					15

Ser Val Lys Gly

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係經合成

<220>

<221> Variant

<222> 1

<223> X 為 L 或 V

<220>

<221> Variant

<222> 4

<223> X 為 M 或 K

<220>

<221> Variant

<222> 5

<223> X 為 R 或 K

<400> 20

Xaa Thr Gly Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr

5

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 21

Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Gly

5

10

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 22

Thr Leu Ser Pro Gln His Phe Thr Tyr Lys Ile Asp

5

10

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 23

Thr Leu Ser Ser Asn His Ser Ile Tyr Thr Ile Ser

5

10

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列







<400> 31

Gly Tyr Ser Tyr Tyr Ser Gly Tyr Val

5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 32

Gly Ser Ser Tyr Ser Thr Gly Tyr Val

5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 33

Gly Ala Ser Tyr Ser Ser Gly Tyr Ile

5

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 34

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Arg Trp Ile Tyr

5

10

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列



<220>

<223> 序列係經合成

<400> 35

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Arg Trp Val Tyr  
                                   5                                  10

<210> 36

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 36

Gly Ile Lys Thr Lys Pro Asn Ile Tyr Ala Thr Glu Tyr Ala Asp  
   1                                  5                                  10                                  15

Ser Val Lys Gly

<210> 37

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 37

Gly Ile Lys Thr Lys Pro Thr Arg Tyr Ala Thr Gln Tyr Ala Asp  
   1                                  5                                  10                                  15

Ser Val Lys Gly

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 38

Leu Thr Gly Met Arg Tyr Phe Asp Tyr

5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 39

Leu Thr Gly Met Lys Tyr Phe Asp Tyr

5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列係經合成

<400> 40

Val Thr Gly Met Arg Tyr Phe Asp Tyr

5



## 七、申請專利範圍：

### 1. 一種抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體，其包含：

VL域，該VL域包含CDR-L1，其包含TL-S/T-S/P/T-Q/N-H-F/S-T/I-Y-K/T-I-G/D/S(SEQ ID NO:15)；CDR-L2，其包含L/I-N/T-S-D/H/S-G/S-S/L/T-H/Y-N/K/Q/I-K/T-G/A-D/S/V(SEQ ID NO:16)；CDR-L3，其包含G/A-S/A/Y-S/Y-Y-S/A/Y-S/Y/T-GY-V/I(SEQ ID NO:17)；及

VH域，該VH域包含CDR-H1，其包含GFTFS-N/A-RW-I/V-Y(SEQ ID NO:18)；CDR-H2，其包含GIKTKP-N/A/T-I/R-YAT-E/Q-YADSVKG(SEQ ID NO:19)；及CDR-H3，其包含L/V-TG-M/K-R/K-YFDY(SEQ ID NO:20)。

### 2. 如請求項1之抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體，其中

該VL域包含CDR-L1，其包含如SEQ ID NOs:21至24中任一者所示之序列，CDR-L2，其包含如SEQ ID NOs:25至28中任一者所示之序列，及CDR-L3，其包含如SEQ ID NOs:29至33中任一者所示之序列，及

該VH域包含CDR-H1，其包含如SEQ ID NOs:34至35中任一者所示之序列，CDR-H2，其包含如SEQ ID NOs:36至37中任一者所示之序列，及CDR-H3，其包含如SEQ ID NOs:38至40中任一者所示之序列。

### 3. 如請求項1之抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體，其中

該VL域包含SEQ ID NO:3-8中任一者，及

該VH域包含SEQ ID NO: 11-14中任一者。

### 4. 如請求項1之抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體，其中

該VL域包含SEQ ID NO:8，及

該VH域包含SEQ ID NO:14。

5. 如請求項1至4中任一項抗- $\alpha_5\beta_1$ 之抗體，其中該抗體為人類抗體或人類化抗體。
6. 如請求項1至4中任一項之抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體，其中該抗體為嵌合抗體。
7. 如請求項1至4中任一項之抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體，其中該抗體包含人類IgG之Fc序列。
8. 如請求項7之抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體，其中該Fc序列包含N297A取代。
9. 如請求項7之抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體，其中該Fc序列為人類IgG1或人類IgG4。
10. 如請求項9之抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體，其中該抗體包含缺乏抗體依賴性細胞毒性(ADCC)效應功能之Fc序列。
11. 如請求項1至4中任一項之抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體，其中該抗體係選自由以下所組成之群：Fab、Fab'、F(ab)'<sub>2</sub>、單鏈Fv(scFv)、Fv片段、雙功能抗體、線性抗體、雙特異性抗體、結合 $\alpha_5\beta_1$ 之抗體片段及多特異性抗體。
12. 如請求項1至4中任一項之抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體，其與治療劑結合。
13. 如請求項12之抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體，其中該治療劑為選自由以下組成之群的成員：細胞毒性劑、放射性同位素及化學治療劑。
14. 如請求項1至4中任一項之抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體，其可偵測標記物

結合。

15. 如請求項14之抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體，其中該可偵測標記物係選自由以下組成之群：放射性同位素、螢光染料及酶。
16. 一種經分離之核酸分子，其包含一序列，該序列編碼如請求項1至4中任一項之抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體之可變重鏈域（VH）或可變輕鏈域（VL）或VH及VL域兩者。
17. 一種表現載體，其包含如請求項16之核酸。
18. 一種宿主細胞，其包含如請求項17之表現載體。
19. 一種組合物，其包含如請求項1至4中任一項之抗體及醫藥學上可接受之載劑。
20. 一種如請求項1至4中任一項之抗體之抗- $\alpha_5\beta_1$ 用途，其係用於製備偵測疑似含有 $\alpha_5\beta_1$ 蛋白之樣品中之 $\alpha_5\beta_1$ 蛋白的藥劑，該偵測方法包含
  - (a)使如請求項1至4中任一項之抗體與該樣品接觸；及
  - (b)偵測該抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體與該 $\alpha_5\beta_1$ 蛋白間之複合物的形成。
21. 如請求項20之用途，其中該樣品係來自經診斷患有涉及異常血管生成、異常血管滲透性及/或血管滲漏之疾病的患者。
22. 一種如請求項1至4中任一項之抗- $\alpha_5\beta_1$ 抗體的用途，其係用於製造治療個體之異常血管生成及/或血管滲透性或滲漏之疾病之藥物。
23. 如請求項22之用途，其中該藥物係與VEGF拮抗劑共同投與。

24. 如請求項23之用途，其中該疾病或病症為選自由以下組成之群的成員：癌症、眼部疾病及自體免疫疾病。
25. 如請求項23之用途，其中該VEGF拮抗劑係在該抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體之前投與。
26. 如請求項23之用途，其中該VEGF拮抗劑與該抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體係同時投與。
27. 如請求項23之用途，其中該個體係先經該VEGF拮抗劑治療直至該個體對VEGF拮抗劑治療無反應，該個體隨後經該抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體治療。
28. 如請求項23之用途，其中該疾病為癌症，且該個體係於該癌症為非侵襲性時先經該VEGF拮抗劑治療，且於該癌症為侵襲性時經該抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體治療。
29. 如請求項23之用途，其中該個體之組織具有相較於未經受該疾病之個體組織較升高之 $\alpha 5\beta 1$ 水平。
30. 如請求項23之用途，其中該藥物進一步包含選自由以下組成之群的治療劑：抗贅生劑、化學治療劑、生長抑制劑及細胞毒性劑。
31. 如請求項23之用途，其中該VEGF拮抗劑為抗-VEGF抗體。
32. 如請求項31之用途，其中該抗-VEGF抗體為貝伐單抗 (bevacizumab)。
33. 一種組合物，其包含VEGF拮抗劑、如請求項1至4中任一項之抗體及醫藥學上可接受之載劑。
34. 一種如請求項33之組合物之用途，其係用於製造藥物，

該藥物抑制罹患特徵為異常血管生成或血管滲透性或滲漏之疾病之個體中之異常血管生成及/或血管滲透性或滲漏。

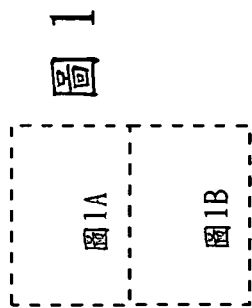
35. 如請求項34之用途，其中該疾病為選自由以下組成之群的成員：癌症、眼病及自體免疫疾病。
36. 如請求項34之用途，其中該疾病為選自由以下組成之群的成員：實體腫瘤、轉移性腫瘤、軟組織腫瘤、具有眼部新生血管之疾病、具有異常血管生成之發炎疾病、於個體體內移植之後出現的疾病及具有纖維血管組織異常增生之疾病。
37. 如請求項35之用途，其中該癌症為選自由以下組成之群的成員：乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、肺癌、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkins lymphoma, NHL)、腎細胞癌、間皮瘤、軟組織癌及多發性骨髓瘤。
38. 如請求項34之用途，其中該疾病為選自由以下組成之群的成員：視網膜病、年齡相關之黃斑部變性、虹膜紅變、牛皮癬、牛皮癬性關節炎、發炎性腎臟疾病、溶血性尿毒癥候群、糖尿病性腎病、關節炎、發炎性腸病、慢性炎症、慢性視網膜脫離、慢性葡萄膜炎、慢性玻璃體炎、角膜移植排斥反應、角膜新生血管、角膜移植新生血管、克隆氏病(Crohn's disease)、近視、眼部新生血管疾病、骨關節炎、佩吉特氏病(Pagets disease)、類天疱瘡、多動脈炎、雷射後放射狀角膜切開術、視網膜新生血管、休格連氏症候群(Sogrens syndrome)、潰瘍性結



腸炎、移植排斥反應、肺部炎症、腎病症候群、水腫、與惡性疾病有關之腹水、中風、血管纖維瘤及新生血管性青光眼。

39. 一種如請求項1至4中任一項之抗體的用途，其係用於製造治療罹患疾病之個體之藥物，其中該個體曾對以VEGF拮抗劑治療該疾病之治療有反應，但部分地或不再對該VEGF拮抗劑產生反應。
40. 如請求項39之用途，其中該個體之罹病組織具有相較於未經受該疾病之個體組織或未罹病組織較升高之 $\alpha 5\beta 1$ 水平。
41. 如請求項39之用途，其中以選自由以下組成之群的治療劑進一步投與該個體：抗贅生劑、化學治療劑、生長抑制劑及細胞毒性劑。
42. 一種VEGF拮抗劑的用途，其係用於製造治療罹患疾病之個體之藥物，其中該個體曾對以如請求項1至4中任一項之抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體治療該疾病之治療有反應，但部分地或不再對該抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體產生反應。
43. 一種套組，其係用於偵測已經VEGF拮抗劑治療之個體之 $\alpha 5\beta 1$ ，該套組包含：
  - (a)如請求項1至4中任一項之抗- $\alpha 5\beta 1$ 抗體；及
  - (b)使用說明書。

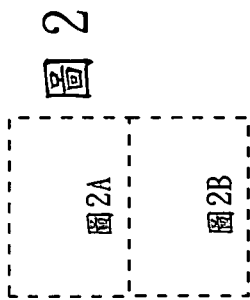
八、圖式：



	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	A	B	C	D	28	29	30	31	32	33	34	35	36			
人類λIII	-	S	E	L	T	Q	D	-	P	A	V	S	V	A	L	G	Q	T	V	R	I	T	C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Y	Y
倉鼠 18C12	Q	P	V	L	T	Q	S	-	P	S	A	S	A	S	L	G	N	S	V	K	I	T	C	T	L	S	S	Q		H	S	T	Y	T	Y	T	I	G	W	Y	Y		
h18C12.v1.1	D	I	V	L	T	Q	S	-	P	S	A	S	A	S	L	G	N	S	V	K	I	T	C	T	L	S	S	Q		H	S	T	Y	T	Y	T	I	G	W	Y	Y		
h18C12.v3	E	P	V	L	T	Q	S	-	P	S	A	S	A	S	L	G	A	S	V	K	L	T	C	T	L	S	S	Q		H	S	T	Y	T	Y	T	I	G	W	Y	Y		
h18C12.v6	E	P	V	L	T	Q	S	-	P	S	A	S	A	S	L	G	A	S	V	K	L	T	C	T	L	S	S	Q		H	S	T	Y	T	Y	T	I	G	W	Y	Y		
h18C12.v6.1.Lam3	S	S	E	L	T	Q	D	-	P	A	V	S	V	A	L	G	Q	T	V	R	I	T	C	T	L	S	S	Q		H	S	T	Y	T	Y	T	I	G	W	Y	Y		
h18C12.v6.2.Lam3	S	S	E	L	T	Q	D	-	P	A	V	S	V	A	L	G	Q	T	V	R	I	T	C	T	L	S	S	Q		H	S	T	Y	T	Y	T	I	G	W	Y	Y		
h18C12.v6.1.5	S	S	E	L	T	Q	D	-	P	A	V	S	V	A	L	G	Q	T	V	R	I	T	C	T	L	S	S	Q		H	S	T	Y	T	Y	T	I	G	W	Y	Y		

圖1A





Kabat#	Kabat - CDR H1																																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40	
倉鼠 18C12	E	V	H	L	V	E	S	G	G	D	L	V	Q	P	G	S	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	W	V	R	Q	A			
人類 VH III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	W	N	W	V	R	Q	A
h18C12.v3	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	W	V	R	Q	A					
h18C12.v6	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	R	W	I	Y	W	V	R	Q	A					
h18C12.v6.1.Lam3	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	A	R	W	I	Y	W	V	R	Q	A					
h18C12.v6.2.Lam3	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	A	R	W	I	Y	W	V	R	Q	A					
h18C12.v6.1.5	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	A	R	W	I	Y	-	-	W	V	R	Q	A			

圖 2A

Kabat#	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
倉鼠18C12	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	N	S	L	Y
人類VH III	P	G	K	G	L	E	W	V	S	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y
h18C12.v3	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	N	T	L	Y
h18C12.v6	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	K	T	K	P	N	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	N	T	L	Y
h18C12.v6.1.Lam3	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	K	T	K	P	A	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	N	T	L	Y
h18C12.v6.2.Lam3	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	K	T	K	P	A	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	N	T	L	Y
h18C12.v6.1.5	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	K	T	K	P	A	I	Y	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	N	T	L	Y

Kabat - CDR H2

Choithia - CDR H2  
接觸 - CDR H2

Kabat#	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	101	102	103	104	105	106	107
--------	----	----	----	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Kabat - CDR H3  
Choithia - CDR H3  
接觸 - CDR H3

SEQ ID NO	9	10	11	12	13	13	14																									
倉鼠18C12	L	Q	M	N	S	L	R	V	D	D	T	A	I	Y	Y	C	T	S	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T
人類VH III	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	X	X	X	X	X	X	X	X	X	W	G	Q	G	T
h18C12.v3	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	T	G	M	R	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T
h18C12.v6	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	T	G	M	K	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T
h18C12.v6.1.Lam3	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	T	G	M	K	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T
h18C12.v6.2.Lam3	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	T	G	M	K	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T
h18C12.v6.1.5	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	T	G	M	K	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T

圖2B



純系	CDR-L1										CDR-L2										CDR-L3										SEQ IDNo																									
	24	25	26	27	A	28	29	30	31	32	33	34	50	A	B	C	D	51	52	53	54	55	56	89	90	91	92	93	94	95		96	97	SEQ IDNo																						
h18C12.v3	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	89	90	91	92	93	94	95	96	97	SEQ IDNo											
h18C12.v6	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	A	A	Y	Y	A	Y	G	Y	V	30	A	A	Y	Y	A	Y	G	Y	V	30	A	A	Y	Y	A	Y	G	Y	V	30	SEQ IDNo
h18C12.v7	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	Y	S	Y	Y	S	G	Y	V	31	G	Y	S	Y	Y	S	G	Y	V	31	G	Y	S	Y	Y	S	G	Y	V	31	SEQ IDNo
h18C12.v9	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	Y	S	T	G	Y	V	32	G	S	S	Y	S	T	G	Y	V	32	G	S	S	Y	S	T	G	Y	V	32	SEQ IDNo
h18C12.v15	T	L	S	P	Q	H	F	T	Y	K	I	D	22	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	SEQ IDNo
h18C12.v16	T	L	S	S	N	H	S	I	Y	T	I	S	23	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	SEQ IDNo
h18C12.v28	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	24	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	A	S	Y	S	S	G	Y	I	33	G	A	S	Y	S	S	G	Y	I	33	G	A	S	Y	S	S	G	Y	I	33	SEQ IDNo
h18C12.v30	T	L	T	Q	H	S	T	Y	T	I	G	24	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	SEQ IDNo	
h18C12.v51	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	N	S	D	G	S	H	N	K	G	D	25	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	SEQ IDNo
h18C12.v54	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	I	N	S	D	G	S	H	K	K	G	V	26	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	SEQ IDNo
h18C12.v70	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	T	S	H	G	L	H	Q	K	G	V	27	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	SEQ IDNo
h18C12.v78	T	L	S	S	Q	H	S	T	Y	T	I	G	21	L	N	S	D	S	T	Y	I	T	A	V	28	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	G	S	S	Y	S	S	G	Y	V	29	SEQ IDNo

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

圖 3

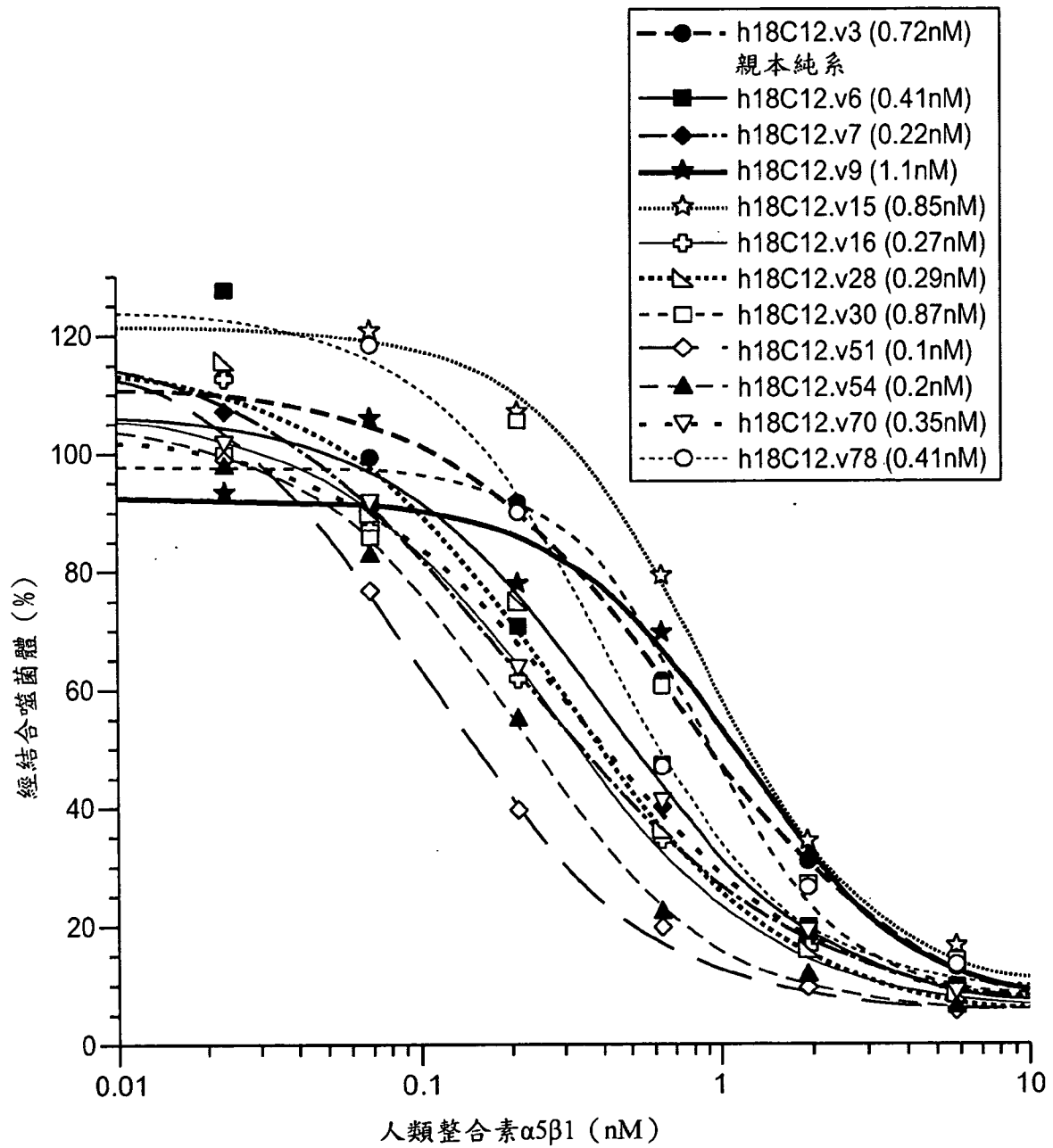


圖4

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

圖5

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

圖6

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

圖7



U937細胞與纖維結合蛋白結合

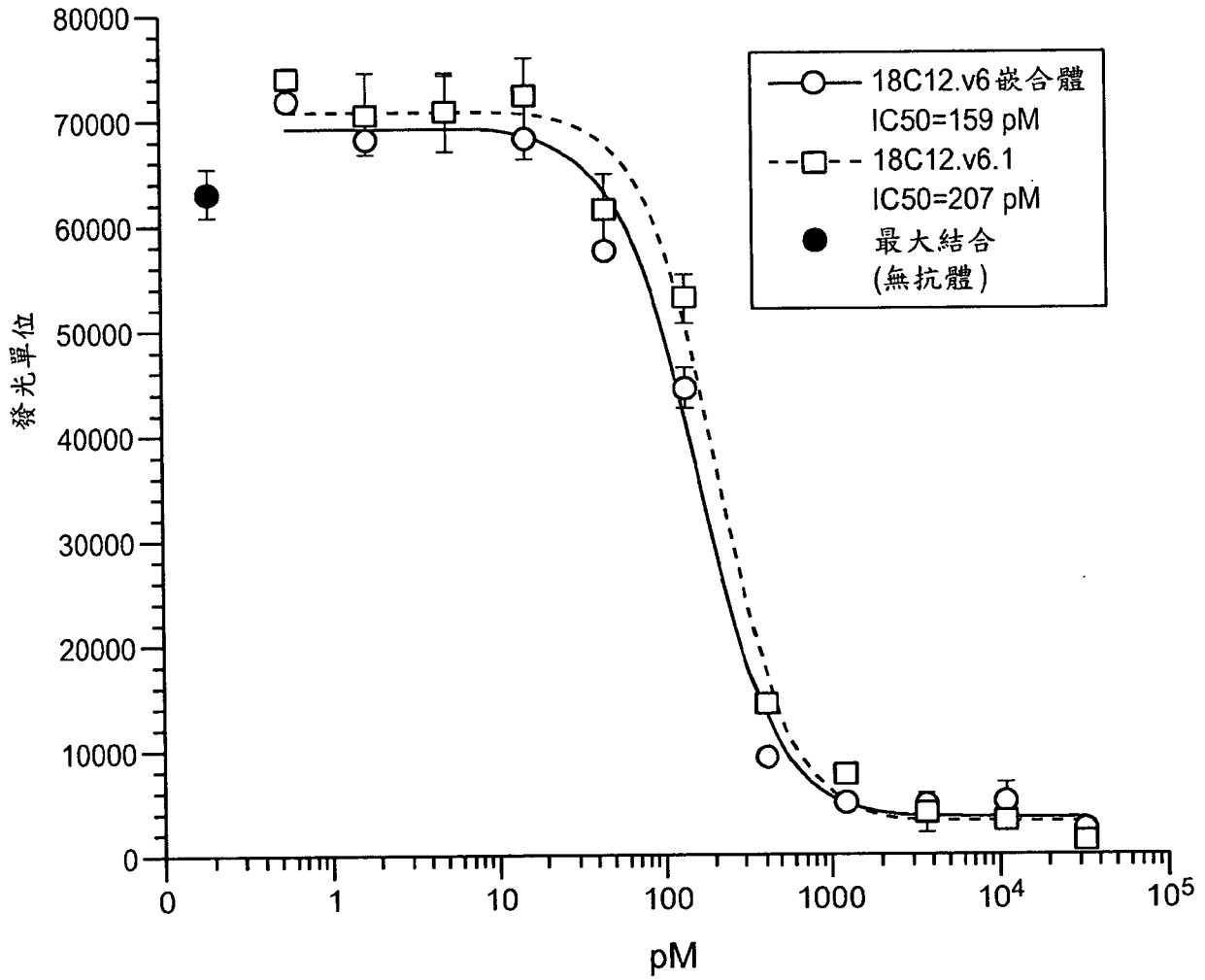


圖 8



U937細胞與纖維結合蛋白結合

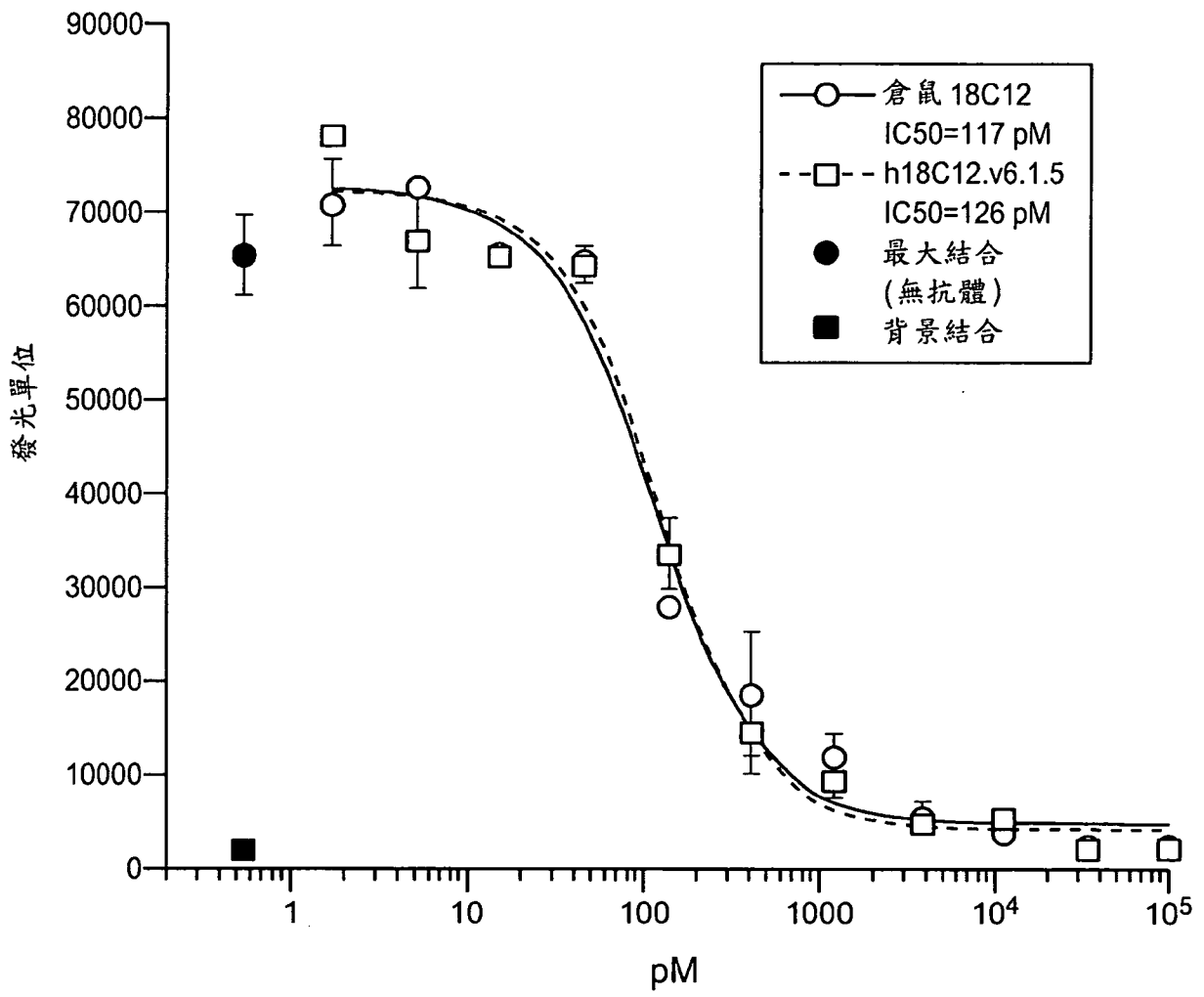


圖9

$\alpha 5\beta 1$ 與纖維結合蛋白結合

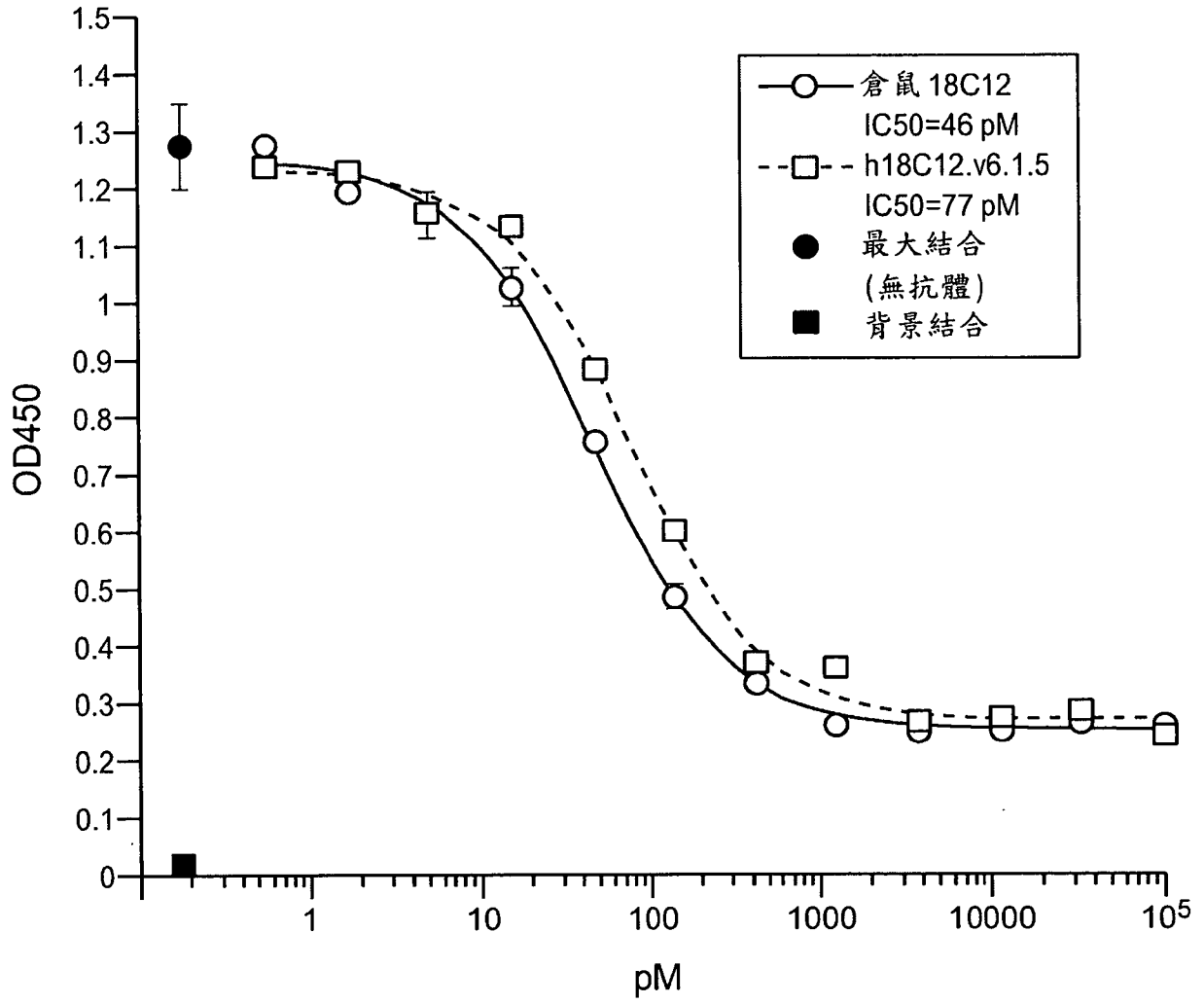


圖 10



在抗體存在下於纖維結合  
蛋白上之HUVEC遷移

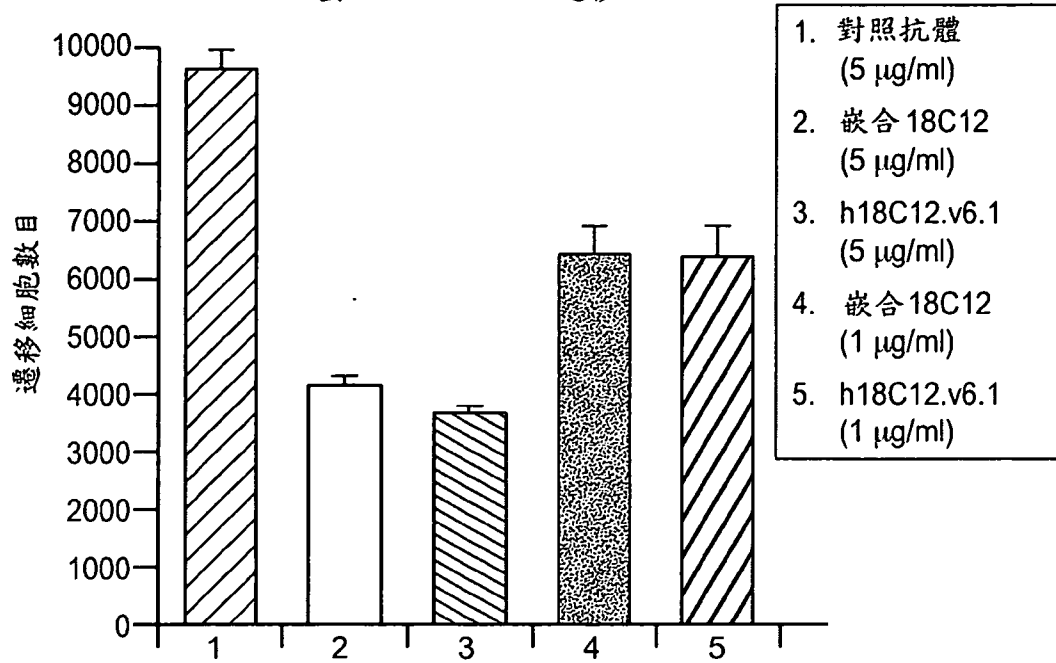


圖 11

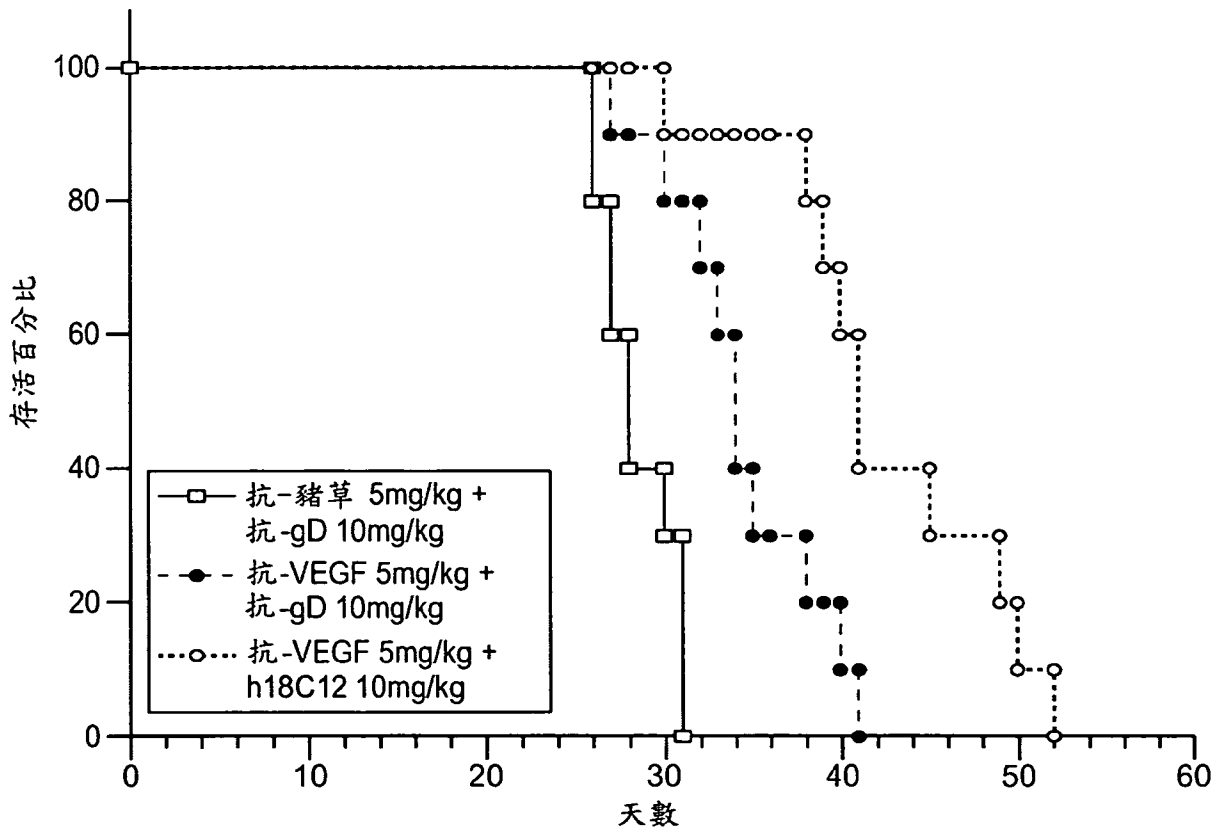


圖 12

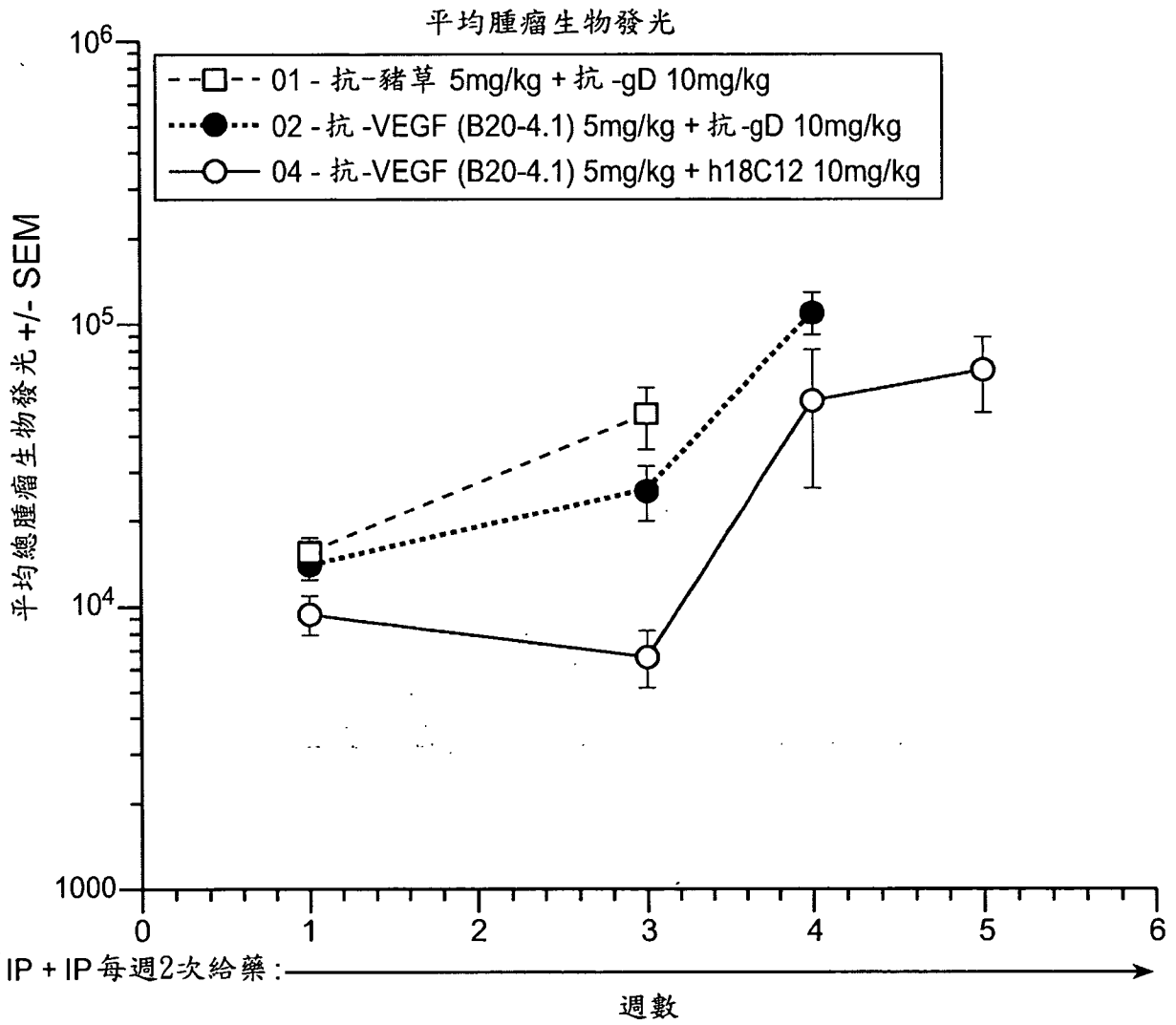


圖13

