



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102325796 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 18

(21) 申请号 200980157346. X *A61K 39/395* (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 02. 23 *A61P 19/08* (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日 *A61P 29/00* (2006. 01)
2011. 08. 22 *A61P 31/00* (2006. 01)
A61P 35/00 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据 *A61P 37/06* (2006. 01)
PCT/JP2009/053218 2009. 02. 23 *G01N 33/15* (2006. 01)

(87) PCT申请的公布数据 *G01N 33/50* (2006. 01)
W02010/095270 JA 2010. 08. 26 *G01N 33/53* (2006. 01)
C12P 21/08 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

FERM BP-10831 2007. 05. 29

FERM BP-10830 2007. 05. 29

(71) 申请人 株式会社遗传科技
地址 日本北海道

(72) 发明人 今重之 上出利光

(74) 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司 72003
代理人 崔香丹 张永康

(51) Int. Cl.
C07K 16/46 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 12 页
序列表 9 页 附图 5 页

(54) 发明名称

抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,更具体而言是特异性识别人 $\alpha 9$ 整合素的单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体以及人抗体;产生上述单克隆抗体的杂交瘤细胞;上述单克隆抗体的制备方法;上述杂交瘤细胞的制备方法;含有上述抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体的治疗剂;含有上述抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体的诊断剂;抑制人 $\alpha 9$ 整合素活性的化合物的筛选方法等。

1. 一种抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其含有序列号 1 ~ 12 中的任一个氨基酸序列。
2. 一种抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其含有序列号 1、3、5、7、9 或 11 的氨基酸序列。
3. 一种抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其含有序列号 1、3、5、7、9 和 11 的氨基酸序列。
4. 一种抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其含有序列号 2、4、6、8、10 或 12 的氨基酸序列。
5. 一种抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其含有序列号 2、4、6、8、10 和 12 的氨基酸序列。
6. 一种抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其含有作为重链的互补性决定区 CDRH 中的氨基酸序列的序列号 1 ~ 6 中的任一个氨基酸序列、作为轻链的互补性决定区 CDRL 中的氨基酸序列的序列号 7 ~ 12 中的任一个氨基酸序列。
7. 如权利要求 1 ~ 6 中任一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其抑制人 $\alpha 9$ 整合素与 $\alpha 9$ 整合素的配体的结合。
8. 如权利要求 1 ~ 7 中任一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其为单克隆抗体。
9. 如权利要求 1 ~ 8 中任一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其为嵌合抗体
10. 如权利要求 1 ~ 8 中任一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其为人源化抗体。
11. 如权利要求 1 ~ 8 中任一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其为人抗体。
12. 一种抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其由保藏号 FERM BP-10830 或 FERM BP-10831 所标记的杂交瘤细胞产生。
13. 一种癌、炎症性疾病、传染病、自身免疫性疾病或骨病的治疗剂,其作为有效成分含有权利要求 1 ~ 12 中任一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体。
14. 一种癌、炎症性疾病、传染病、自身免疫性疾病或骨病的治疗剂,其作为有效成分含有权利要求 1 ~ 12 中任一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体和抗人 $\alpha 4$ 整合素抗体两者。
15. 一种癌、炎症性疾病、传染病、自身免疫性疾病或骨病的诊断剂,其作为有效成分含有权利要求 1 ~ 12 中任一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体。
16. 一种细胞,其产生权利要求 1 ~ 12 中任一项所述的抗人 α 整合素抗体。
17. 一种杂交瘤细胞,其标记为保藏号 FERM BP-10830 或 FERM BP-10831。
18. 一种抑制 $\alpha 9$ 整合素活性的化合物的筛选方法,其特征在于,使用含有 $\alpha 9$ 整合素的氨基酸序列的肽。

抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体及其用途。更具体而言,本发明涉及特异性识别人 $\alpha 9$ 整合素的单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体以及人抗体;产生上述单克隆抗体的杂交瘤细胞;上述单克隆抗体的制备方法;上述杂交瘤细胞的制备方法;含有上述抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体的治疗剂;含有上述抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体的诊断剂;及抑制人 $\alpha 9$ 整合素活性的化合物的筛选方法等。

背景技术

[0002] 细胞与细胞外基质之间的粘附,通过整合素所代表的跨膜的细胞粘附蛋白而进行。整合素是以 α 链和 β 链为 1 : 1 的异二聚体来构成,迄今为止已发现 18 种 α 链、8 种 β 链,它们的组合中至少 24 种已得到鉴定。已知各整合素分别识别特异性细胞外基质(配体)。而且已逐步明确,作为含有整合素的跨膜细胞粘附蛋白的作用,不仅在于使细胞与细胞外基质粘附、固定,而且还将来自细胞外基质的信息转换为细胞内信号,负责调节细胞增殖、运动、细胞死亡、分化等。

[0003] 根据相对于配体的特异性和功能,将整合素分类为亚家族,划分为:胶原受体;层粘连蛋白受体;识别纤连蛋白、玻连蛋白等中所含的 Arg-Gly-Asp (RGD) 序列的 RGD 受体;只存在于白细胞中的白细胞特异性受体。 $\alpha 4$ 整合素和 $\alpha 9$ 整合素,均不属于上述这些亚家族而被称为 $\alpha 4$ 整合素亚家族。

[0004] 作为与 $\alpha 4$ 和 $\alpha 9$ 整合素相结合的配体,已知有骨桥蛋白 (osteopontin, 以下简称“OPN”)、纤连蛋白的 EDA 部位、前肽-血管性血友病因子 (pp-vWF)、组织型转谷氨酰胺酶 (tTG)、第 XIII 凝血因子以及血管细胞粘附分子 (VCAM-1:Vascular Cell Adhesion Molecule-1) 等。而且,作为 $\alpha 4$ 整合素特异性识别的配体已知有纤连蛋白的 CS-1 区、Mad CAM-1 ($\alpha 4 \beta 7$) 等。另一方面,作为 $\alpha 9$ 整合素特异性识别的配体,已知有肌腱蛋白 C、纤溶酶等。

[0005] 作为一种细胞外基质 (ECM:Extracellular matrix) 的 OPN 是分子量约 41kDa 的分泌型磷酸化酸性糖蛋白,是一种被认为在乳汁、尿、肾小管、破骨细胞、造骨细胞、巨噬细胞、活化 T 细胞、肿瘤组织等之中广泛表达的分子。分子中央部位具有细胞粘附序列 GRGDS 并在人 OPN 中具有 SVVYGLR 序列,在小鼠 OPN 中具有 SLAYGLR 序列,紧随其后具有凝血酶酶切位点,通过 GRGDS 序列与 RGD 受体的整合素粘附,通过 SVVYGLR 序列或 SLAYGLR 序列与 $\alpha 4(\alpha 4 \beta 1)$ 和 $\alpha 9(\alpha 9 \beta 1)$ 整合素粘附。

[0006] 研究发现 $\alpha 4 \beta 1$ 和 $\alpha 9 \beta 1$ 双方存在下述方式上的差异: $\alpha 4 \beta 1$ 与未被凝血酶切断的 OPN(非切断型 OPN) 和被凝血酶切断的 N 末端片段(切断型 OPN) 这两者结合,而 $\alpha 9 \beta 1$ 只与切断型 OPN 结合。

[0007] $\alpha 4$ 与 $\alpha 9$ 整合素以及 $\beta 1$ 的整合素亚单位的氨基酸序列是公知的,登记在 GenBank 上。而且已知:这些整合素在种类之间氨基酸序列的相似性高。

[0008] W002/081522 中公开了利用 OPN 缺失小鼠或 OPN 的中和抗体而基于抑制 OPN 功能

的风湿性关节炎、肝炎的治疗效果。而且,在该公报中还公开了作为 $\alpha 4$ 整合素、 $\alpha 9$ 整合素的识别序列的 SVVYGLR 序列对炎症性疾病发病很重要,OPN 的受体在免疫活性细胞等之中表达,与炎症性疾病相关。

[0009] 专利文献 1 :W002/081522

发明内容

[0010] 发明要解决的课题

[0011] 目前,已知有各种癌、炎症性疾病、传染病(感染症)、自身免疫性疾病和骨病的治疗药,希望开发出具有进一步改善的治疗效果的癌、炎症性疾病、传染病、自身免疫性疾病和骨病的预防药和/或治疗药等。

[0012] 迄今为止,本发明人等,着眼于整合素尤其是 $\alpha 9$ 整合素,进行了各种研究,结果发现 $\alpha 9$ 整合素的特异性抑制抗体具有癌抑制效果和抗炎效果,制备了产生 5 种单克隆抗体的杂交瘤细胞(1K11、21C5、24I11、25B6 和 28S1)(分别作为 FERM BP-10510、FERM BP-10511、FERM BP-10512、FERM BP-10513 和 FERM BP-10832 保藏于茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1、中央第 6(邮政编码 305-8566)、独立行政法人产业技术综合研究所特许生物保藏中心(保藏日期:最初 4 个为 2006 年 2 月 15 日,最后一个为 2007 年 5 月 29 日))。

[0013] 在这种情形下,进一步需求药效优良的单克隆抗体或者替代性单克隆抗体。

[0014] 解决课题的方法

[0015] 本发明人等,为了开发出药效优于前述 5 种单克隆抗体的抗体或者替代性单克隆抗体,进行了精心研究,成功制备出产生新型单克隆抗体的杂交瘤细胞,从而完成了本发明。

[0016] 即,本发明提供下面所述的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体、其单克隆抗体、产生其的细胞、含有上述抗体的治疗剂、抑制 $\alpha 9$ 整合素活性的化合物的筛选方法等。

[0017] (1) 一种抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其含有序列号 1 ~ 12 中任一个氨基酸序列。

[0018] (2) 一种抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其含有序列号 1、3、5、7、9 或 11 的氨基酸序列。

[0019] (3) 一种抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其含有序列号 1、3、5、7、9 和 11 的氨基酸序列。

[0020] (4) 一种抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其含有序列号 2、4、6、8、10 或 12 的氨基酸序列。

[0021] (5) 一种抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其含有序列号 2、4、6、8、10 和 12 的氨基酸序列。

[0022] (6) 一种抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其含有作为重链的互补性决定区(CDRH)中的氨基酸序列的序列号 1 ~ 6 中任一个氨基酸序列、作为轻链的互补性决定区(CDRL)中的氨基酸序列的序列号 7 ~ 12 中任一个氨基酸序列。

[0023] (7) 如上述(1) ~ (6)中任一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其抑制人 $\alpha 9$ 整合素与 $\alpha 9$ 整合素的配体的结合。

[0024] (8) 如上述(1) ~ (7)中任一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其为单克隆抗体。

[0025] (9) 如上述(1) ~ (8)中任一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其为嵌合抗体。

[0026] (10) 如上述(1) ~ (8)中任一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其为人源化抗体。

[0027] (11) 如上述(1) ~ (8)中任一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其为人抗体。

[0028] (12) 一种抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体,其由保藏号 FERM BP-10830 或 FERMBP-10831 所标记的杂交瘤细胞产生。

[0029] (13) 一种癌、炎症性疾病、传染病、自身免疫性疾病或骨病的治疗剂,其作为有效成分含有上述(1)~(12)中任一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体。

[0030] (14) 一种癌、炎症性疾病、传染病、自身免疫性疾病或骨病的治疗剂,其作为有效成分含有上述(1)~(12)中任一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体和抗人 $\alpha 4$ 整合素抗体两者。

[0031] (15) 一种癌、炎症性疾病、传染病、自身免疫性疾病或骨病的诊断剂,其作为有效成分含有上述(1)~(12)中任一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体。

[0032] (16) 一种细胞,其产生上述(1)~(12)中任一项所述的抗人 α 整合素抗体。

[0033] (17) 一种杂交瘤细胞,其标记为保藏号 FERM BP-10830 或 FERM BP-10831。

[0034] (18) 一种抑制 $\alpha 9$ 整合素活性的化合物的筛选方法,其特征在于,使用含有 $\alpha 9$ 整合素的氨基酸序列的肽。

[0035] 发明效果

[0036] 基于本发明,提供新型抗 α 整合素抗体。本发明的抗 $\alpha 9$ 整合素抗体,显示出优良的抑制 $\alpha 9$ 整合素功能的作用,并且发挥对癌(例如癌细胞的增殖、转移)、炎症性疾病(例如,风湿性关节炎、变形性关节炎、肝炎、支气管哮喘、纤维症、糖尿病、动脉硬化、多发性硬化症、炎症性肠病(溃疡性结肠炎、克罗恩氏病等))、传染病(例如肝炎)、自身免疫性疾病(例如,系统性红斑狼疮、多发性肌炎、自身免疫性甲状腺疾病、肾小管间质性肾炎、重症肌无力症)和骨病(例如骨质疏松症)等的治疗效果。并且,含有本发明的抗 $\alpha 9$ 整合素抗体和抗 $\alpha 4$ 整合素抗体这两者的医药组合物,发挥进一步得到改善的癌、炎症性疾病等的治疗效果。本发明的抗体能够在病理学上测定 $\alpha 9$ 整合素在细胞、组织中的表达,因此,还能够作为诊断药使用。

附图说明

[0037] 图 1A 是表示分析抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体(K33N和M35A)的重链的含有互补性决定区(CDR)的可变区的氨基酸序列的结果的图。图中示出了分别采用两个不同序列分析软件分析K33N和M35A的结果。

[0038] 图 1B 是表示分析抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体(K33N和M35A)的轻链的含有互补性决定区(CDR)的可变区的氨基酸序列的结果的图。图中示出了分别采用两个不同序列分析软件分析K33N和M35A的结果。

[0039] 图 2 是表示通过人 $\alpha 9$ 整合素表达细胞(人黑色素瘤细胞G361)和OPN的 $\alpha 9$ 整合素结合位点的肽(SVVYGLR)研究抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体(本发明的2个克隆(K33N、M35A)、其它5个克隆(1K11、21C5、24I11、25B6、28S1)和Y9A2)的细胞粘附抑制效果的结果的图。作为阴性对照使用了人·骨桥蛋白的单克隆抗体(5A1)。

[0040] 图 3 是表示通过人 $\alpha 9$ 整合素表达细胞(人黑色素瘤细胞G361)和肌腱蛋白C片段的 $\alpha 9$ 整合素结合位点的肽研究抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体(本发明的2个克隆(K33N、M35A)、其它5个克隆(1K11、21C5、24I11、25B6、28S1)和Y9A2)的细胞粘附抑制效果的结果的图。作为阴性对照使用了人·骨桥蛋白的单克隆抗体(5A1)。

[0041] 图 4 是表示研究新型抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体(K33N)和Y9A2对人 $\alpha 9$ 整合素表达细胞进行竞争反应的结果的图。

具体实施方式

[0042] [发明经过情况]

[0043] 2004年11月,作为 $\alpha 4$ 整合素抗体的Tysabri(注册商标)(natalizumab),生物基因艾迪克公司(Biogen Idec Inc.,美国马萨诸塞州)和Elan公司(Elan Corporation,爱尔兰)以作为多发性硬化症治疗药获得美国食品药品监督管理局(FDA)的批准。而且,Tysabri(注册商标)在以克罗恩氏病、风湿性关节炎等疾病为对象进行临床开发。此外,所谓P4C2的抗人 $\alpha 4\beta 1$ 整合素单克隆抗体得到实验室水平的应用。

[0044] 但是, $\alpha 9$ 整合素的抗体中,对人和豚鼠的 $\alpha 9$ 整合素显示出特异性的被称为Y9A2的单克隆抗体(A. Wang et al., (1996) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15, 664-672)已供于实验用途,但并未应用于临床。

[0045] 本发明中,通过注意以下方面并深入研究,能够获得药效可望更加优良的人 $\alpha 9$ 整合素的新型抗体。

[0046] (1) 人 $\alpha 9$ 整合素过量表达株的制备

[0047] 为了制备 $\alpha 9$ 整合素的抗体,向作为小鼠成纤维细胞的NIH-3T3细胞中导入基因,建立过量表达人 $\alpha 9$ 整合素的细胞株,以该细胞作为抗原对小鼠进行免疫。

[0048] (2) 杂交瘤的筛选

[0049] 为了从经由细胞融合所得到的各种杂交瘤中有效地获得只与人 $\alpha 9$ 整合素发生反应的克隆,使用在CHO-K1细胞中表达了相同整合素家族的人 $\alpha 4$ 整合素的细胞,选拔与其它整合素不显示交叉反应性并与亲细胞(CHO-K1)的细胞表面抗原不反应的克隆,由此有效地获得与人 $\alpha 9$ 整合素发生特异性反应的抑制抗体。

[0050] [本发明的抗 $\alpha 9$ 整合素抗体]

[0051] 本发明提供一种人 $\alpha 9$ 整合素的单克隆抗体。本发明中,所谓“抗体”是指可以与作为抗原的 $\alpha 9$ 整合素或者其部分肽进行特异性结合的抗体分子整体或其片断(例如,Fab、Fab'、F(ab')₂等片断),既可以是多克隆抗体也可以是单克隆抗体。在本发明中,优选是指单克隆抗体。而且,本发明中的“抗体”包括嵌合抗体、人源化抗体、人抗体。

[0052] 本发明中,所谓抗体与某蛋白质或其片断“特异性地进行结合”,意思是指该抗体以实质上高的亲和性(高于对其它氨基酸序列的亲和性)与这些蛋白质或其片断的特定氨基酸序列进行结合。在此,所谓“实质上高的亲和性”,是指基于所需测定装置或者方法可使该特定氨基酸序列与其它氨基酸序列有区别地测定出来的程度上的高的亲和性;典型的是指下述结合亲和性:结合常数(K_a)至少为 $10^7 M^{-1}$,优选至少为 $10^8 M^{-1}$,更优选为 $10^9 M^{-1}$,进一步再优选为 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ 、 $10^{12} M^{-1}$ 或其以上,例如最高为 $10^{13} M^{-1}$ 或其以上。

[0053] 本发明中,“单克隆抗体”是指对抗原有高度特异性,识别单一抗原的单克隆抗体。

[0054] 本发明中,所谓“抗体片断”是指全长抗体(whole antibody)的局部,其为抗原结合区或者可变区。例如,抗体片断包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片断。这些抗体片断能够通过抗体的木瓜蛋白酶消化、胃蛋白酶消化等通常公知的方法制备。

[0055] 上述所谓“嵌合抗体”是指采用基因工程技术将本发明中所得到的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体的恒定区改造成具有与人的抗体相同的恒定区的人·小鼠·嵌合抗体(参照欧州专利公开公报EP0125023)。所谓“人源化抗体”,是指采用基因工程技术将本发明中所得

到的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体的 H 链（重链）和 L 链（轻链）的互补性决定区（CDR）以外的一级结构改造成对应于人的抗体的一级结构的抗体。所谓“人抗体”，是指使用导入了人的抗体产生相关的基因的转基因动物制备的单克隆抗体（参照欧州专利公开公报 EP0546073）。

[0056] 更具体而言，本发明首先提供了与迄今为止所制备的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体不同的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体。本发明的优选方式的抗体含有序列号 1、3、5、7、9 或 11 的氨基酸序列。更优选的抗体，是具有选自于由序列号 1、3、5、7、9 和 11 的氨基酸序列所构成的组中的氨基酸序列中的 2 个以上、3 个以上、4 个以上、5 个以上或者 6 个的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体。

[0057] 另外，本发明的其它方式的抗体，含有序列号 2、4、6、8、10 或 12 的氨基酸序列。更优选的抗体，是选自于由序列号 2、4、6、8、10 和 12 的氨基酸序列所构成的组中的氨基酸序列中的 2 个以上、3 个以上、4 个以上、5 个以上或者 6 个的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体。

[0058] 本发明中，特别优选的抗体是由保藏号 FERM BP-10830 或 FERM BP-10831 所标记的杂交瘤细胞产生的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体。

[0059] 下面，详细说明抗 $\alpha 9$ 整合素单克隆抗体的制备，但该抗体的制备并不限于此。

[0060] [$\alpha 9$ 整合素（抗原）]

[0061] 本发明中，作为抗原使用的 $\alpha 9$ 整合素，可以是（1）来自人、其它哺乳动物的表达 $\alpha 9$ 整合素的所有细胞或存在这些细胞的所有组织的蛋白质；（2）将编码 $\alpha 9$ 整合素的基因 DNA、优选 cDNA 导入细菌、酵母、动物细胞等细胞株中而得以表达的重组蛋白质；还可以是（3）合成蛋白质。

[0062] 另外，本发明的 $\alpha 9$ 整合素，还包括与各种哺乳动物的 $\alpha 9$ 整合素的氨基酸序列、特别优选与人 $\alpha 9$ 整合素的氨基酸序列（序列号：13）具有实质上相同的氨基酸序列的多肽。

[0063] 在此所谓“具有实质上相同的氨基酸序列的多肽”，是指只要具有与天然型 $\alpha 9$ 整合素、特别优选来自人的 $\alpha 9$ 整合素实质上相同的生物学的性质即可，可以是具有该氨基酸序列中的多个氨基酸、优选 1 ~ 10 个氨基酸、特别优选 1 ~ 多个（例如，1 ~ 5 个、1 ~ 4 个、1 ~ 3 个、1 ~ 2 个）的氨基酸被取代、缺失和 / 或被修饰的氨基酸序列的突变多肽，以及具有该天然型 $\alpha 9$ 整合素、特别优选来自人的 $\alpha 9$ 整合素的氨基酸序列中被加成有多个氨基酸、优选为 1 ~ 10 个氨基酸、特别优选 1 ~ 多个（例如，1 ~ 5 个、1 ~ 4 个、1 ~ 3 个、1 ~ 2 个）氨基酸的氨基酸序列的突变多肽。并且，还可以具有取代、缺失、修饰及加成中的多个的突变多肽。

[0064] 本发明的 $\alpha 9$ 整合素、尤其是来自人的 $\alpha 9$ 整合素，除了基因重组技术之外，还可以通过适当使用诸如化学合成法、细胞培养方法等本技术领域中公知的方法或其修饰方法来制备。

[0065] 另外，作为突变多肽的制备方法，例如，可以举出：合成寡核苷酸介导点突变法（缺口双链法：gapped duplex）、通过亚硝酸或亚硫酸处理随机导入点突变的方法、通过 Ba131 酶等制备缺失突变体的方法、盒式突变（cassette mutagenesis）法、接头分区法、错误掺入（misincorporation）法、错配引物（mismatch primer）法、DNA 片段合成法等。

[0066] 另外，本发明的 $\alpha 9$ 整合素还包括该 $\alpha 9$ 整合素的“局部”。在此所谓“局部”，是指含有用于与 OPN、肌腱蛋白 C、VCAM-1 等 $\alpha 9$ 整合素配体结合所必需的区域的部分。该 $\alpha 9$ 整合素的“局部”，还可以按后述本技术领域中公知的方法或其修饰方法通过基因重组技术

或化学合成法进行制备,还可以通过蛋白质分解酶等将采用细胞培养方法分离的 $\alpha 9$ 整合素、特别优选来自人的 $\alpha 9$ 整合素进行适当切断来制备。

[0067] 作为抗原,还能够使用通过重组技术在细胞膜上过量表达 $\alpha 9$ 整合素的细胞自身或其膜组分等。

[0068] 本发明的 $\alpha 9$ 整合素,还包括具有与人 $\alpha 9$ 整合素的氨基酸序列(序列号 13)实质上相同的氨基酸序列的多肽。并且,尤其是在本发明中优选使用通过重组技术在细胞膜上过量表达人 $\alpha 9$ 整合素的细胞自身。因此,还存在后述的情况:采用公知的基因工程技术克隆编码人 $\alpha 9$ 整合素的基因(例如 cDNA),制备在细胞膜上过量表达人 $\alpha 9$ 整合素的细胞自身或其细胞膜组分以作为抗原。

[0069] [抗体产生细胞的制备]

[0070] 将抗原自身或与载体、稀释剂一起给药于通过对被免疫的动物给药而可产生抗体的部位。在给药时,为了提高抗体产生能力,也可以给药弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂。通常每 1~6 周给药 1 次,总计进行 2~10 次左右。作为所用的温血动物,例如,可以举出小鼠、猴、兔、狗、豚鼠、大鼠、仓鼠、绵羊、山羊、鸡等,但本发明中优选使用小鼠。

[0071] 当治疗对象是人并且产生 $\alpha 9$ 整合素抑制抗体的动物是小鼠时,优选使用人·小鼠的嵌合抗体或人源化抗体,更优选使用通过导入与抗体产生相关的人基因的小鼠等转基因动物所制备的人单克隆抗体。

[0072] [抗体产生细胞与骨髓瘤细胞的细胞融合]

[0073] 作为骨髓瘤细胞,可使用来自小鼠、大鼠、人等的细胞。例如,可以举出小鼠骨髓瘤 P3U1、P3X63-Ag8、P3X63-Ag8-U1、P3NS1-Ag4、SP2/0-Ag14、P3X63-Ag8-653 等,但优选抗体产生细胞与骨髓瘤细胞来自同种动物,特别优选来自同血系的动物。骨髓瘤细胞可冷冻保存,或通过用添加了马、兔或胎牛血清(FBS)的通常的培养基进行传代而保持繁殖。在细胞融合时优选使用对数增殖期的细胞。本发明中优选使用 P3X63-Ag8-653。

[0074] 作为抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合而形成杂交瘤的方法,可以举出使用聚乙二醇(PEG)的方法、使用仙台病毒的方法、使用电融合装置的方法等。例如,当采用 PEG 法时,可将脾细胞和骨髓瘤细胞以 1~10:1、优选为 5~10:1 的混合比悬浮于含有约 30~60%的 PEG(平均分子量 1000~6000)的适当的培养基或缓冲液中,在温度约 25~37°C、pH6~8 的条件下,使发生反应约 30 秒~3 分钟左右。反应结束后,去除 PEG 溶液,再悬浮于培养基中,接种于细胞孔板中,继续进行培养。

[0075] [杂交瘤细胞的挑选]

[0076] 产生单克隆抗体的杂交瘤细胞的挑选,可以依照公知的方法或基于公知的方法来进行。通常,可通过添加了 HAT(次黄嘌呤、氨基喋呤、胸腺嘧啶脱氧核苷)的动物细胞用培养基来进行。作为挑选和繁殖用培养基,只要杂交瘤细胞能够生长发育的培养基即可使用。例如,可使用含有 1~20%、优选 10~20%的胎牛血清的 RPMI 1640 培养基、含有 1~10%的胎牛血清的 GIT 培养基(和光纯药工业株式会社)或杂交瘤培养用无血清培养基(SFM-101,日水制药株式会社)等。培养温度通常为 20~40°C、优选为约 37°C。培养时间通常为 5 天~3 周、优选为 1 周~2 周。培养通常可在 5% CO₂ 下进行。

[0077] 本发明的单克隆抗体的产生,可以使用《新临床免疫实验操作法(第三部分)》(1997 年,科学评论社)所记载的细胞 ELISA 法进行确认和筛选。当预测若将在免疫中所用

的细胞用于筛选则背景增高、假阳性增多时,能够将下述克隆作为抗人 $\alpha 9$ 整合素的抗体:与在免疫中所用细胞之外的细胞中过量表达的人 $\alpha 9$ 整合素反应且与过量表达人 $\alpha 4$ 整合素的细胞不反应的克隆。对这种克隆反复进行 1 ~ 5 次、优选 2 ~ 4 次有限稀释法,由此能够制备单克隆抗体。

[0078] [抗体的分离纯化]

[0079] 所得到的抗体,可以进行纯化直至均匀。抗体的分离、纯化可以使用通常蛋白质所使用的分离、纯化方法。例如,适当选择、组合亲和色谱(法)等的色谱柱、过滤、超滤、盐析、透析、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电点电泳等,可以分离、纯化抗体 (Antibodies :A Laboratory Manual.Ed Harlow and David Lane,Cold Spring Harbor Laboratory,1988),但并不限于这些。作为在亲和色谱(法)中使用的柱,可以举出蛋白质 A 柱、蛋白质 G 柱。例如,作为使用蛋白质 A 柱的柱,可以举出 Hyper D、POROS、Sepharose F. F. (Amersham Biosciences) 等。

[0080] [抗体的标记化]

[0081] 通过采用公知的方法或者市售的试剂盒,能够对所得到的抗体进行各种标记化(例如,生物素标记、FITC 标记、APC 标记)。本发明中,优选采取使用 Biotin Labeling Kit(同仁化学)的生物素标记。

[0082] 通过如此操作所得到的单克隆抗体,根据需要纯化后,按照常规方法制剂化,能够作为癌、炎症性疾病、传染病、自身免疫性疾病和骨病等的预防和/或治疗剂使用。作为这些预防和/或治疗剂的剂型,能够制成注射剂、点滴用剂等非口服制剂,也能够通过创意设计制成口服制剂来使用。并且,当进行制剂化时,在药事(药剂)上以及药学可接受的范围内,能够使用适于剂型的载体、稀释剂或添加剂等。

[0083] [抗体的药理学的效果]

[0084] 现已逐步明确整合素的作用不仅在于粘附、固定细胞与细胞外基质(ECM)而且还将来自细胞外基质的信息转换为细胞内信号,负责调节细胞的增殖、运动、细胞死亡、分化等。因此,所得到的单克隆抗体,由于能够通过抑制 ECM 与 $\alpha 9$ 整合素的结合来阻断来自 ECM 的信息的细胞内信号传递,所以可治疗与 ECM 相关的疾病。作为与 $\alpha 9$ 整合素结合的 ECM 和 $\alpha 9$ 配体,已知有 OPN、纤连蛋白、前肽-血管性血友病因子(pp-vWF)、组织型转谷氨酰胺酶(tTG)、第 XIII 凝血因子、血管细胞粘附分子(VCAM-1:Vascular Cell Adhesion Molecule-1)、肌腱蛋白 C、纤溶酶等。使用这些 ECM 与表达 $\alpha 9$ 整合素的细胞、癌细胞,通过体外(in vitro)观察在所得到的单克隆抗体的存在下的结合抑制,能够发现本发明的单克隆抗体的对象疾病。

[0085] [含有抗体的医药]

[0086] 以本发明的抗体(尤其是单克隆抗体)作为有效成分的制剂,能够用作癌(例如癌细胞的增殖、转移)、炎症性疾病(例如风湿性关节炎、变形性关节炎、肝炎、支气管哮喘、纤维症、糖尿病、动脉硬化、多发性硬化症、炎症性肠病(溃疡性结肠炎、克罗恩氏病))、传染病(例如,肝炎)、自身免疫性疾病(例如系统性红斑狼疮、多发性肌炎、自身免疫性甲状腺疾病、肾小管间质性肾炎、重症肌无力症)和骨病(例如骨质疏松症)等的治疗剂(therapeutic agent)或者预防剂(prophylactic agent)。

[0087] 给药量,根据给药对象、对象疾病、症状、给药途径等不同,例如,在用于癌患者

的预防和 / 或治疗时,作为本发明抗体的 1 次用量,通常适合为 0.01 ~ 20mg/kg 体重左右、优选为 0.1 ~ 10mg/kg 体重左右,更优选为 0.1 ~ 5mg/kg 体重左右,并以每月 1 ~ 10 次左右、优选为每月 1 ~ 5 次左右来通过静脉注射给药。在其它的非口服给药和口服给药时,可按上述用量给药。在症状特别严重时,还可以根据其症状加大用量或增加给药次数。

[0088] 本发明的抗体,能够将其自身直接或作为适当的医药组合物进行给药。上述给药所用的医药组合物,包括上述抗体或其盐以及药理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。这种组合物,可以制成适于非口服给药或口服给药的剂型来提供。

[0089] 即,作为用于非口服给药的组合物,例如,可以使用注射剂、滴鼻剂、栓剂等,注射剂包括静脉注射剂、皮下注射剂、皮内注射剂、肌肉注射剂、点滴注射剂等剂型。这种注射剂,可按照公知的方法来制备,例如,通过采用通常注射剂所用无菌水性或油性液来溶解、悬浮或者乳化上述抗体来制备。作为注射用的水性液,例如,可以使用生理盐水,含有葡萄糖、蔗糖、甘露醇、其它辅助药的等渗溶液等,还可以并用适当的增溶剂,诸如醇类(例如乙醇)、多元醇类(例如丙二醇、聚乙二醇)、非离子表面活性剂[例如吐温(聚山梨醇酯)80、吐温 20、HCO-50(氢化蓖麻油的聚氧化乙烯(50mol)加合物(adduct))]等。作为油性液,例如,可以使用芝麻油、大豆油等,可以并用苯甲酸苄酯、苄醇等作为增溶剂。制备的注射液,通常装入适当的安瓿、小瓶(vial)、注射器中。直肠给药时所用的栓剂,通过将上述抗体与通常的滴鼻药用基剂、栓剂用基剂混合来制备。另外,通过对上述抗体添加适当的赋形剂并制成冻干制剂,在使用时,可用注射用水、生理盐水等溶解后作为注射液。此外,由于抗体等蛋白质在口服给药时通常被消化器官分解,因此难以口服给药,但通过在抗体片断或修饰的抗体片断和剂型方面进行创意设计,也有口服给药的可能性。

[0090] 上述的非口服用医药组合物,优选制备成适于活性成分的给药量的给药单位的剂型。作为这种给药单位的剂型,可以举出注射剂(安瓿、小瓶、预充式注射器)、滴鼻剂、栓剂等,各给药单位剂型分别通常含有 5 ~ 500mg 的上述抗体,尤其是注射剂优选含有 5 ~ 100mg 的上述抗体,其它剂型优选含有 10 ~ 250mg 的上述抗体。

[0091] 另外,前述的各组合物,只要与上述抗体的配合不产生不良的相互作用,就可以含有其它活性成分。例如,本发明的医药制剂,除了上述抗体之外还可以含有抗人 $\alpha 4$ 整合素抗体。对此时的混合比例并没有特别限定,例如,可调节抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体:抗人 $\alpha 4$ 整合素抗体的比率处于 1 ~ 99 : 99 ~ 1 的比率范围内。

[0092] [含有本发明的单克隆抗体的诊断剂]

[0093] 含有本发明的单克隆抗体的医药组合物,可以用作炎症性疾病、例如,风湿性关节炎、肝炎、支气管哮喘、纤维症、糖尿病、癌转移、动脉硬化、多发性硬化症、肉芽肿等的诊断剂以及抑制器官移植后的慢性排斥反应、系统性自身免疫疾病·红斑狼疮·葡萄膜炎·白塞病(Behcet's disease)·多发性肌炎·系膜增殖性肾炎·结节病等自身免疫性疾病的诊断剂。本发明的单克隆抗体,能够特异性识别 $\alpha 9$ 整合素,因此,可以用于待测液中的 $\alpha 9$ 整合素的定量、尤其是夹层免疫测定法、竞争法或免疫测量法等进行的定量等。当各上述免疫学的测定法应用于本发明的测定方法时,不需要设定特别的条件、操作等。可以在各方法的常规条件、操作法的基础上再加上本领域技术人员通常的技术性考虑来构建测定系统。这些通常的技术方法的详细内容,可以参照总论、书籍等。

[0094] 如上所述,通过使用本发明的抗体,可以高灵敏度地定量 $\alpha 9$ 整合素。并且,通过

采取使用本发明的抗体的、生物体内的 $\alpha 9$ 整合素的定量法,能够进行与 $\alpha 9$ 整合素相关的各种疾病的诊断。例如,在检测到 $\alpha 9$ 整合素的浓度的增减时,可以诊断为与 $\alpha 9$ 整合素相关的疾病,例如炎症性疾病的可能性高或者将来患这种病的可能性高。另外,本发明的单克隆抗体,能够用于特异性检测存在于体液、组织等待测对象中的 $\alpha 9$ 整合素。而且,还可以在用于纯化 $\alpha 9$ 整合素的抗体柱的制备、包含于纯化时的各组分中的 $\alpha 9$ 整合素的测定、待测细胞内 $\alpha 9$ 整合素的行迹变动分析等中使用。

[0095] [抑制人 $\alpha 9$ 整合素活性的化合物的筛选方法]

[0096] 通过利用本发明的抗体所识别的人 $\alpha 9$ 整合素上的抗原表位(抗原决定簇),能够筛选抑制人 $\alpha 9$ 整合素活性的化合物。具体而言,本发明提供一种抑制人 $\alpha 9$ 整合素活性的低分子化合物的筛选方法,其特征在于,使用含有人 $\alpha 9$ 整合素的氨基酸序列的肽(下称“肽 A”)。

[0097] 在本发明的筛选方法中,例如,对下述(i)与(ii)进行比较:(i)使肽 A 与人 $\alpha 9$ 整合素的配体(例如肌腱蛋白 C、纤溶酶等)接触的情况;(ii)使肽 A 与配体和试验化合物接触的情况。关于工序(i)和(ii)的比较,例如,通过测定配体与肽 A 的结合量来进行。为了容易比较上述结合量,优选使用已采用公知的方法标记的配体。对于采用这种方法所得到的备选化合物,进行确认是否抑制人 $\alpha 9$ 整合素活性的实验,从而获得抑制人 $\alpha 9$ 整合素活性的化合物。

[0098] 在此,作为待测物质,可以使用多肽、蛋白质、来自生物体的非肽化合物、合成化合物、微生物培养物、细胞提取液、植物提取液、动物组织提取液等,既可以是新型化合物,也可以是公知的化合物。

[0099] 所选择的化合物,与本发明的抗体同样可用作癌、炎症性疾病、传染病、自身免疫性疾病和骨病等的预防和/或治疗剂。

[0100] 下面结合实施例进一步详细说明本发明,但本发明的范围并不局限于此。

[0101] 实施例

[0102] 实施例 1

[0103] [抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体的制备]

[0104] 抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体的制备,按下述操作对 3 只 BALB/c 小鼠进行免疫。首先,将人 $\alpha 9$ 整合素表达细胞(人 $\alpha 9$ /NIH-3T3 细胞)以 3×10^6 细胞/只进行腹腔内给药,再在此 1 周后和 2 周后,将人 $\alpha 9$ /NIH-3T3 细胞以 3×10^6 细胞/只进行腹腔内给药。进而在 1 周后,将人 $\alpha 9$ /NIH-3T3 细胞以 2×10^6 细胞/只进行静脉内给药。将与人 $\alpha 9$ /CHO-K1 细胞和内源性表达人 $\alpha 9$ 整合素的人黑色素瘤细胞株(G361 细胞)反应且与表达人 $\alpha 4$ 整合素的 CHO-K1 细胞不反应的克隆作为抗 $\alpha 9$ 整合素抗体。其结果建立了产生抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体的杂交瘤细胞的 2 个克隆(K33N、M35A)。

[0105] 在此所得到的杂交瘤细胞 K33N 和 M35A,于 2007 年 5 月 29 日,分别以保藏号 FERM BP-10830 和 FERM BP-10831,保藏于日本茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1、中央第 6(邮政编码 305-8566)、独立行政法人产业技术综合研究所特许生物保藏中心。

[0106] 实施例 2

[0107] [抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体的互补性决定区(CDR)的分析]

[0108] 从产生人 $\alpha 9$ 整合素抗体(K33N、M35A)的杂交瘤中提取 mRNA,经过逆转录制备

cDNA。以该 cDNA 为模板,使用 ScFv 克隆用引物 (Light Primer Mix、Heavy Primer Mix, アマシヤムバイオサイエンス社 (Amersham Biosciences 公司) 制造) 进行 PCR,分别延长、扩增抗体的重链和轻链的可变区。接着,基于常规方法将 PCR 产物嵌入 pCRII TOPO 载体中。对其进行测序而确定氨基酸序列。对于各抗体分别进行 3 次上述操作。

[0109] 其结果, K33N 和 M35A 的重链和轻链的可变区和 CDR 区的氨基酸序列,如图 1A 和图 1B 所示。CDR 区的氨基酸序列,具体而言,如下所示。

[0110] (重链)

[0111] [CDRH1]

[0112] K33N :SYVMN(序列号 1)

[0113] M35A :SYWIH(序列号 2)

[0114] [CDRH2]

[0115] K33N :WIFPGSGNTKYNEKFKGK(序列号 3)

[0116] M35A :EINPSSGRTNFIENFETK(序列号 4)

[0117] [CDRH3]

[0118] K33N :SWVSYERGYFFDY(序列号 5)

[0119] M35A :LAYGNYSWFAY(序列号 6)

[0120] (轻链)

[0121] [CDRL1]

[0122] K33N :RASENIYYSLA(序列号 7)

[0123] M35A :RASETVDSYGNTFMH(序列号 8)

[0124] [CDRL2]

[0125] K33N :NANSLED(序列号 9)

[0126] M35A :LASNLES(序列号 10)

[0127] [CDRL3]

[0128] K33N :KQAYDVPYT(序列号 11)

[0129] M35A :QQNEDPYT(序列号 12)

[0130] 此外,图 1A 和图 1B 中还表示出采用不同于上述序列分析方法 (GTS) 的分析方法 (不同的序列分析软件) 所获得的序列 (JNBio 和 Takara)。各方法的详细内容如下所述。

[0131] [JN Biosciences 的序列分析法 (K33N)]

[0132] 采用含有 10% 胎牛血清 (FBS (fetal bovine serum), HyClone 公司制造) 的 TIL Media I 培养基 (免疫生物研究所) 在 7.5% CO₂、37°C 环境下培养杂交瘤细胞 (K33N) 使其增殖。总 RNA (总核糖核酸), 依照 Invitrogen 公司的规程 (protocol) 使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司制造), 从约 3×10⁶ 个的杂交瘤细胞中提取。对基于使用 Oligo-dT 引物 (寡聚脱氧胸苷引物) 的逆转录反应的 cDNA 的制备而言, 采用了 GeneRacer 试剂盒 (Invitrogen 公司制造), 依照了 Invitrogen 公司的规程。重链和轻链的可变区 cDNA, 使用分别相当于小鼠恒定区 γ 1 和 κ 的 3' 引物和 GeneRacer 试剂盒附带的 GeneRacer 5' 引物 (5' -CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3' (序列号 14)), 并使用 Phusion DNA 聚合酶 (New England Biolabs 公司制造), 采用 PCR 进行扩增。用于重链可变区 (VH) 的 PCR 扩增的 3' 引物是 5' -GCCAGTGGATAGACAGATGG-3' (序列号 15)。用于 L 链可变区 (VL) 的 PCR 扩

增的 3' 引物是 5' -GATGGATACAGTTGGTGCAGC-3' (序列号 16)。将扩增后的 VH 和 VL 的 cDNA 通过 pCR4Blunt-TOPO 载体 (Invitrogen 公司制造) 中进行亚克隆以确定序列。采用 Tocore (Menlo Park) 进行了可变区的 DNA 序列分析。

[0133] [Takara 的序列分析法 (M35A)]

[0134] 在培养、增殖杂交瘤细胞 (M35A) 后,使用 RNAiso (タカラバイオ社 (TaKaRa Bio Inc., 宝生物株式会社) 制造),以酸-异硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步法 (Acid Guanidine-Phenol-Chloroform 法, AGPC 法) 提取细胞的总 RNA。所提取的 RNA 以常规方法进行 DNase I 处理 (脱氧核糖核酸酶 I 处理),然后进行苯酚氯仿处理,去除 DNase I,基于乙醇沉淀法进行纯化。使所得到的 RNA 再次悬浮于蒸馏水中用于分析。将 DNase I 处理后的约 1 μ g 的 RNA 作为模板使用随机引物 Random Primer (9mer) 通过逆转录酶 Reverse Transcriptase M-MLV (核糖核酸酶 RNase H free) 进行逆转录反应。对于可变区的 PCR 扩增而言,以各逆转录反应液的一部分作为模板,并且重链使用引物 Heavy Primer 1 和 Heavy Primer 2 (アマシヤムバイオサイエンス社制造),轻链则使用引物 Light Primer Mix (アマシヤムバイオサイエンス社制造),而 PCR 酶则使用 TaKaRa LA Taq (タカラバイオ社制造)。

[0135] 采用琼脂糖凝胶对由 PCR 所得到的 DNA 片断进行电泳,切出条带并将凝胶溶解出来,由此进行 DNA 的纯化。将纯化的 DNA 进行 TA 克隆于 pMD20-T 载体上。可变区的 DNA 序列分析,通过使用 pMD20-T 载体中所含的 M13-47 引物序列来确定基因序列。对于测序反应 (定序反应) 使用 BigDye Terminators v3.1 cycle sequencing kit (BigDye 终结者 V3.1 的循环测序试剂盒,アプライドバイオシステムズ社 (Applied Biosystems, Inc.) 制造),并依照同社的规程,通过 ABI3730 序列发生器 (定序器) (アプライドバイオシステムズ社 (Applied Biosystems, Inc.) 制造) 来实施。

[0136] 根据图 1A 和图 1B 可知,在基于所使用的分析方法 (或者分析软件) 所得到的序列中,可见稍微有所不同,但对于 CDR 的氨基酸序列而言,未见到由分析方法的不同引起的差异。

[0137] 实施例 3

[0138] [抗人 α 9 整合素抗体的细胞粘附抑制效果]

[0139] 在细胞粘附时, α 9 整合素与包括 OPN、纤连蛋白、肌腱蛋白 C、VCAM-1 等的细胞外基质 (ECM) 的配体结合,因此通过抑制 α 9 整合素表达细胞 (人黑色素瘤细胞 G361) 与配体的结合,研究了对所得到的新型抗人 α 9 整合素抗体的细胞粘附抑制。

[0140] OPN 肽使用了结合有 BSA (牛血清白蛋白) 的 SVVYGLR 肽;TN-C fn3 (RAA) 使用了在大肠杆菌中对人肌腱蛋白 -C 的纤连蛋白 III 的重复序列 (Fibronectin Type III repeat) 的第三区域所表达的蛋白 (将该区域内的 RGD 序列转换为 RAA 序列)。

[0141] 将 OPN 肽或者肌腱蛋白 C 片段 (TN-C fn3 (RAA)) (5 μ g/mL) 在 96 孔培养板中、37°C 下放置 1 小时后,以 0.5% BSA/PBS 进行封闭。用 0.25% BSA/DMEM 培养基调节人黑色素瘤细胞 G361 以使其形成为 1×10^5 个/mL,并添加各浓度的抗人 α 9 整合素抗体。将添加了抗体的 G361 细胞分别以 200 μ L 加入到固相的 96 孔培养板中,在 37°C 下反应 1 小时。用 PBS 清洗 2 次后,接着用 0.5% 结晶紫/20% 甲醇对粘附细胞进行固定、染色。用蒸馏水清洗 3 次后,用 20% 醋酸溶解,测定 590nm 中的吸光度。此外,作为阴性对照使用了人·骨桥蛋白的

单克隆抗体 (5A1) ;作为阳性对照使用了预先制备的 5 种抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体 (1K11、21C5、24I11、25B6、28S1)。

[0142] 抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体对 OPN 肽与 G361 细胞的粘附的影响结果示于图 2 中, 抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体对肌腱蛋白 C 片段与 G361 细胞的粘附的影响结果示于图 3 中。

[0143] 在 OPN 肽与 G361 细胞的粘附中, M35A 与阴性对照 5A1 以及阳性对照 1K11、25B6、28S1 同样地, 细胞粘附抑制的效果小。另一方面, K33N 与阳性对照 21C5、24I11 相比, 少量即可抑制细胞粘附, 显示出与 Y9A2 同等的细胞粘附抑制效果。在肌腱蛋白 C 片段与 G361 细胞的粘附中, M35A 的细胞粘附抑制效果小, K33N 少量即可抑制细胞粘附, 其细胞粘附抑制效果与 Y9A2 相同程度地明显强于阳性对照 21C5、24I11。如此, 尤其是 K33N, 与其它抗体相比, 显示出特别明显的细胞粘附抑制效果。

[0144] 实施例 4

[0145] [抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体的识别位点的差异]

[0146] 新制备的抗人 $\alpha 9$ 整合素抗体 K33N 的细胞粘附抑制效果, 显示出与 Y9A2 同样的行迹变动, 因此, 通过采用 FACS 测定两种抗体对人 $\alpha 9$ 整合素表达细胞 (h $\alpha 9$ /CHO) 的竞争反应, 研究了识别位点的差异。

[0147] 在生物素标记的 K33N 或 Y9A2 (5 μ g/mL、100 μ L) 中添加其 100 倍量的 K33N、Y9A2、阴性对照 IgG (0.5mg/mL、100 μ L) 后, 与人 $\alpha 9$ 整合素细胞 (h $\alpha 9$ /CHO、 1×10^7 /mL、100 μ L) 发生反应 (4 $^{\circ}$ C、30 分钟), 用 FACS 缓冲液 (0.5% BSA/PBS) 清洗细胞。将链霉亲和素标记 APC (0.5 μ g/mL、100 μ L) 添加于细胞溶液中, 以 4 $^{\circ}$ C、20 分钟的条件发生反应。再次用 FACS 缓冲液清洗细胞后, 使用 7-AAD (0.05mg/mL、20 μ L) 对死亡细胞进行染色。然后, 再次用 FACS 缓冲液清洗, 采用 FACS 测定了细胞。

[0148] 如图 4 所示, 若使生物素标记 Y9A2 和无标记 Y9A2 对人 $\alpha 9$ 整合素表达细胞发生竞争反应, 则结合有荧光物质的细胞明显减少至接近背景, 但在生物素标记 Y9A2 与无标记 K33N 共存的情况下, 可见结合了荧光物质的细胞减少, 但没有减少至接近背景。另一方面, 若在生物素标记 K33N 中添加无标记 K33N, 则对人 $\alpha 9$ 整合素表达细胞进行竞争, 结合有荧光物质的细胞明显减少, 但在添加无标记 K33N 之前, 即使添加无标记 Y9A2, 结合有荧光物质的细胞也没有减少。因此, 若 Y9A2 和 K33N 识别相同抗原表位则显示有竞争, 但由于未显示出完全的竞争, 所以表明 Y9A2 和 K33N 识别不同的抗原表位而不是相同的抗体。

[0149] 工业实用性

[0150] 本发明的抗 $\alpha 9$ 整合素抗体, 显示出优良的 $\alpha 9$ 整合素功能抑制作用, 并起到治疗癌 (例如癌细胞的增殖、转移)、炎症性疾病 (例如风湿性关节炎、变形性关节炎、肝炎、支气管哮喘、纤维症、糖尿病、动脉硬化、多发性硬化症、炎症性肠病 (溃疡性结肠炎、克罗恩氏病等))、传染病 (例如肝炎)、自身免疫性疾病 (例如系统性红斑狼疮、多发性肌炎、自身免疫性甲状腺疾病、肾小管间质性肾炎、重症肌无力症) 和骨病 (例如骨质疏松症) 等治疗效果。并且, 含有本发明的抗 $\alpha 9$ 整合素抗体和抗 $\alpha 4$ 整合素抗体这两者的医药组合物, 起到进一步得到改善的治疗癌、炎症性疾病等的治疗效果。本发明的抗体, 能够在病理学上检测细胞或组织中 $\alpha 9$ 整合素的表达, 因此还可以作为诊断药来加以利用。

[0001]

序列表 (SEQUENCE LISTING)

<110> 株式会社遗传科技 (Gene Techno Science Co., Ltd.)

<120> 抗人 α 9 整合素抗体及其用途 (ANTI-HUMAN α 9 INTEGRIN ANTIBODY AND USE THEREOF)

<130> G11-0028

<140> PCT/JP2009/053218

<141> 2009-02-23

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial)

<220>

<223> K33N CDRH1

<400> 1

Ser Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial)

<220>

<223> CDRH1 M35A

<400> 2

Ser Tyr Trp Ile His
1 5

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial)

<220>

<223> CDRH2 K33N

<400> 3

Trp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

[0002]

<220>

<223> CDRL1 K33N

<400> 7

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Tyr Ser Leu Ala
 1 5 10

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial)

<220>

<223> CDRL1 M35A

<400> 8

Arg Ala Ser Glu Thr Val Asp Ser Tyr Gly Asn Thr Phe Met His
 1 5 10 15

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial)

<220>

<223> CDRL2 K33N

<400> 9

Asn Ala Asn Ser Leu Glu Asp
 1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial)

<220>

<223> CDRL2 M35A

<400> 10

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial)

[0004]

<220>

<223> CDRL3 K33N

<400> 11

Lys Gln Ala Tyr Asp Val Pro Tyr
1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial)

<220>

<223> CDRL3 M35A

<400> 12

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Tyr
1 5

<210> 13

<211> 1035

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 13

Met Gly Gly Pro Ala Ala Pro Arg Gly Ala Gly Arg Leu Arg Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu Ala Leu Val Val Ala Gly Ile Pro Ala Gly Ala Tyr Asn Leu
20 25 30

Asp Pro Gln Arg Pro Val His Phe Gln Gly Pro Ala Asp Ser Phe Phe
35 40 45

Gly Tyr Ala Val Leu Glu His Phe His Asp Asn Thr Arg Trp Val Leu
50 55 60

Val Gly Ala Pro Lys Ala Asp Ser Lys Tyr Ser Pro Ser Val Lys Ser
65 70 75 80

Pro Gly Ala Val Phe Lys Cys Arg Val His Thr Asn Pro Asp Arg Arg
85 90 95

Cys Thr Glu Leu Asp Met Ala Arg Gly Lys Asn Arg Gly Thr Ser Cys

[0005]

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

[0006]

325					330					335				
Val Thr	Val Tyr	Ile Asn	Arg Gly	Asn Gly	Ala Leu	Glu Glu	Gln Leu							
	340			345		350								
Ala Leu	Thr Gly	Asp Gly	Ala Tyr	Asn Ala	His Phe	Gly Glu	Ser Ile							
	355		360			365								
Ala Ser	Leu Asp	Asp Leu	Asp Asn	Asp Gly	Phe Pro	Asp Val	Ala Ile							
	370		375		380									
Gly Ala	Pro Lys	Glu Asp	Asp Phe	Ala Gly	Ala Val	Tyr Ile	Tyr His							
385		390			395		400							
Gly Asp	Ala Gly	Gly Ile	Val Pro	Gln Tyr	Ser Met	Lys Leu	Ser Gly							
		405		410			415							
Gln Lys	Ile Asn	Pro Val	Leu Arg	Met Phe	Gly Gln	Ser Ile	Ser Gly							
	420			425		430								
Gly Ile	Asp Met	Asp Gly	Asn Gly	Tyr Pro	Asp Val	Thr Val	Gly Ala							
	435		440			445								
Phe Met	Ser Asp	Ser Val	Val Leu	Leu Arg	Ala Arg	Pro Val	Ile Thr							
	450		455		460									
Val Asp	Val Ser	Ile Phe	Leu Pro	Gly Ser	Ile Asn	Ile Thr	Ala Pro							
465		470			475		480							
Gln Cys	His Asp	Gly Gln	Gln Pro	Val Asn	Cys Leu	Asn Val	Thr Thr							
		485		490		495								
Cys Phe	Ser Phe	His Gly	Lys His	Val Pro	Gly Glu	Ile Gly	Leu Asn							
		500		505		510								
Tyr Val	Leu Met	Ala Asp	Val Ala	Lys Lys	Glu Lys	Gly Gln	Met Pro							
	515		520			525								
Arg Val	Tyr Phe	Val Leu	Leu Gly	Glu Thr	Met Gly	Gln Val	Thr Glu							
	530		535		540									
Lys Leu	Gln Leu	Thr Tyr	Met Glu	Glu Thr	Cys Arg	His Tyr	Val Ala							

[0007]

545	550	555	560
His Val Lys Arg	Arg Val Gln Asp Val	Ile Ser Pro Ile Val	Phe Glu
	565	570	575
Ala Ala Tyr Ser	Leu Ser Glu His Val	Thr Gly Glu Glu Glu	Arg Glu
	580	585	590
Leu Pro Pro Leu	Thr Pro Val Leu Arg	Trp Lys Lys Gly Gln	Lys Ile
	595	600	605
Ala Gln Lys Asn	Gln Thr Val Phe Glu	Arg Asn Cys Arg Ser	Glu Asp
	610	615	620
Cys Ala Ala Asp	Leu Gln Leu Gln Gly	Lys Leu Leu Leu Ser	Ser Met
	625	630	640
Asp Glu Lys Thr	Leu Tyr Leu Ala Leu	Gly Ala Val Lys Asn	Ile Ser
	645	650	655
Leu Asn Ile Ser	Ile Ser Asn Leu Gly	Asp Asp Ala Tyr Asp	Ala Asn
	660	665	670
Val Ser Phe Asn	Val Ser Arg Glu Leu	Phe Phe Ile Asn Met	Trp Gln
	675	680	685
Lys Glu Glu Met	Gly Ile Ser Cys Glu	Leu Leu Glu Ser Asp	Phe Leu
	690	695	700
Lys Cys Ser Val	Gly Phe Pro Phe Met	Arg Ser Lys Ser Lys	Tyr Glu
	705	710	715
Phe Ser Val Ile	Phe Asp Thr Ser His	Leu Ser Gly Glu Glu	Glu Val
	725	730	735
Leu Ser Phe Ile	Val Thr Ala Gln Ser	Gly Asn Thr Glu Arg	Ser Glu
	740	745	750
Ser Leu His Asp	Asn Thr Leu Val Leu	Met Val Pro Leu Met	His Glu
	755	760	765
Val Asp Thr Ser	Ile Thr Gly Ile Met	Ser Pro Thr Ser Phe	Val Tyr

[0008]

770	775	780																	
Gly	Glu	Ser	Val	Asp	Ala	Ala	Asn	Phe	Ile	Gln	Leu	Asp	Asp	Leu	Glu				
785					790					795					800				
Cys	His	Phe	Gln	Pro	Ile	Asn	Ile	Thr	Leu	Gln	Val	Tyr	Asn	Thr	Gly				
				805					810					815					
Pro	Ser	Thr	Leu	Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Ser	Ile	Ser	Phe	Pro	Asn	Arg				
			820					825					830						
Leu	Ser	Ser	Gly	Gly	Ala	Glu	Met	Phe	His	Val	Gln	Glu	Met	Val	Val				
		835					840					845							
Gly	Gln	Glu	Lys	Gly	Asn	Cys	Ser	Phe	Gln	Lys	Asn	Pro	Thr	Pro	Cys				
	850					855					860								
Ile	Ile	Pro	Gln	Glu	Gln	Glu	Asn	Ile	Phe	His	Thr	Ile	Phe	Ala	Phe				
865					870					875					880				
Phe	Thr	Lys	Ser	Gly	Arg	Lys	Val	Leu	Asp	Cys	Glu	Lys	Pro	Gly	Ile				
				885					890					895					
Ser	Cys	Leu	Thr	Ala	His	Cys	Asn	Phe	Ser	Ala	Leu	Ala	Lys	Glu	Glu				
			900					905					910						
Ser	Arg	Thr	Ile	Asp	Ile	Tyr	Met	Leu	Leu	Asn	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys				
		915					920					925							
Lys	Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Ile	Gln	Phe	Met	Ser	Arg	Ala	Lys	Val	Lys				
	930					935					940								
Val	Asp	Pro	Ala	Leu	Arg	Val	Val	Glu	Ile	Ala	His	Gly	Asn	Pro	Glu				
945					950					955					960				
Glu	Val	Thr	Val	Val	Phe	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Leu	Glu	Pro	Arg	Gly				
				965					970					975					
Tyr	Val	Val	Gly	Trp	Ile	Ile	Ala	Ile	Ser	Leu	Leu	Val	Gly	Ile	Leu				
			980					985					990						
Ile	Phe	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	Leu	Leu	Trp	Lys	Met	Gly	Phe	Phe	Arg				

[0009]

995	1000	1005	
Arg Arg Tyr Lys Glu Ile Ile 1010	Glu Ala Glu Lys Asn 1015	Arg Lys Glu 1020	
Asn Glu Asp Ser Trp Asp Trp 1025	Val Gln Lys Asn Gln 1030	Gln 1035	
<210> 14			
<211> 23			
<212> DNA			
<213> 人工序列 (Artificial)			
<220>			
<223> 引物 (primer)			
<400> 14			
cgactggagc acgaggacac tga			23
<210> 15			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> 人工序列 (Artificial)			
<220>			
<223> 引物 (primer)			
<400> 15			
gccagtggat agacagatgg			20
<210> 16			
<211> 21			
<212> DNA			
<213> 人工序列 (Artificial)			
<220>			
<223> 引物 (primer)			
<400> 16			
gatggataca gttggtgcag c			21

抗人 α 9整合素抗体重链CDR

K33N

GTS 1: -VKLQESGPELVKPGASVKISCKASGYSFTSSYMNVVKKRPGQGLEWIGW 50JN Bio 1: QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTSSYMNVVKKRPGQGLEWIGW 50GTS 51: IFPGSGNTKYNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQVSSLTSEDSAVYFCARSW 100JN Bio 51: IFPGSGNTKYNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQVSSLTSEDSAVYFCARSW 100GTS 101: VSYERGYFDYWGQGTTLTVSS 122JN Bio 101: VSYERGYFDYWGQGTSLTVSS 122

M35A

GTS 1: VKLQESGTKLVKPGASVRLSCKASGYTFTSSYWIH-WVKQSPGQGLEWIGEI 50Takara 1: VKLQESGTKLVKPGASVRLSCKASGYTFTSSYWIH-WVKQSPGQGLEWIGEI 50GTS 51: NPSSGRTNF IENFETKATLTVDRSSTAYMQLT-SLTSEDSAVYYCARLAY 100Takara 51: NPSSGRTNF IENFETKATLTVDRSSTAYMQLT-SLTSEDSAVYYCARLAY 100GTS 101: GNYSW---FAYWGQGTTLTVSS 119Takara 101: GNYSW---FAYWGQGTTLTVSS 119

图 1A

抗人 α 9整合素抗体轻链CDR

K33N

GTS 1: DIQMTQSPASLAASVGETVTLTCRASENIYYSLAWYQQKQKSPQLLIYNJN Bio 1: DIQMTQSPASLAASVGETVTLTCRASENIYYSLAWYQQKQKSPQLLIYN 50GTS 51: ANSLEDGVPSPRFSGSGSGTQYSMKINSMQPEDTATYFCKQAYDVPYTFGG 100JN Bio 51: ANSLEDGVPSPRFSGSGSGTQYSMKINSMQPEDTATYFCKQAYDVPYTFGG 100

GTS 101: GTKLELK

JN Bio 101: GTKLEIK

M35A

GTS 1: QIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETVDSYGNTFMHWYQQKPGQPPKL 50Takara 1: QIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETVDSYGNTFMHWYQQKPGQPPKL 50GTS 51: LIYLASNLESGVPVRFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNED-PY 100Takara 51: LIYLASNLESGVPVRFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNED-PY

GTS 101: TFGGGTNWKNR 112

Takara 101: TFGGGTKLEIKR 112

图 1B

OPN(SVVYGLR)

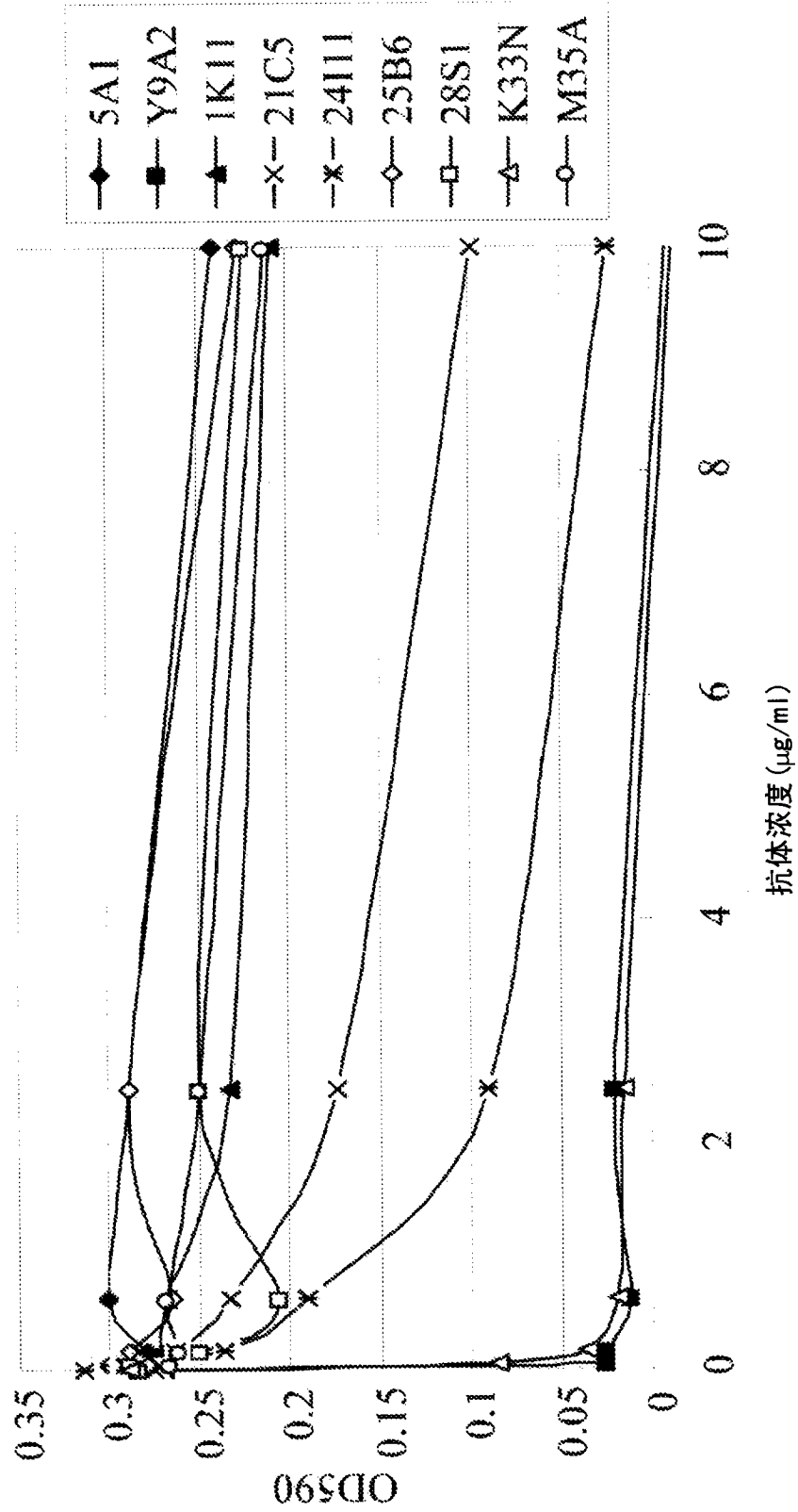


图 2

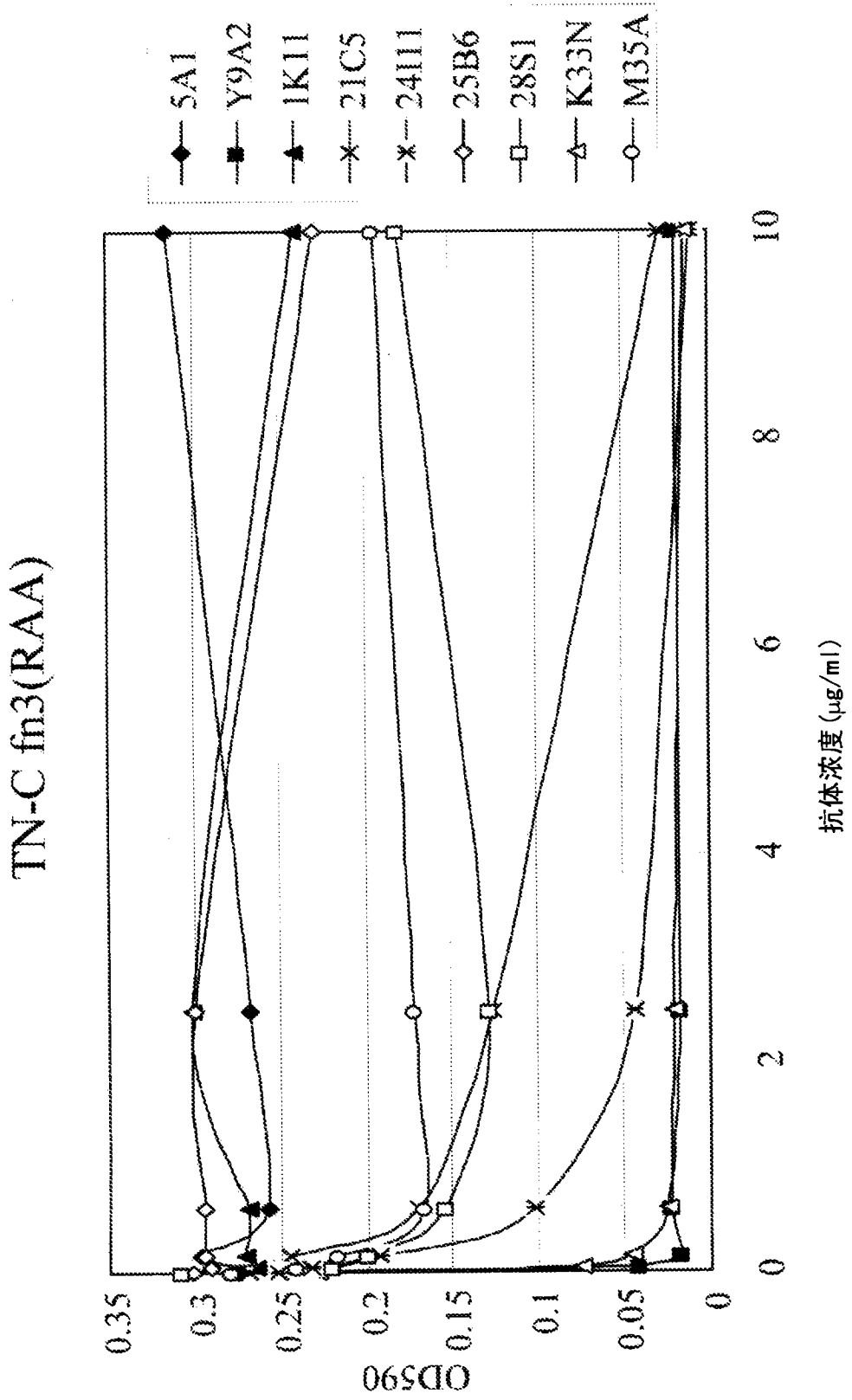


图 3

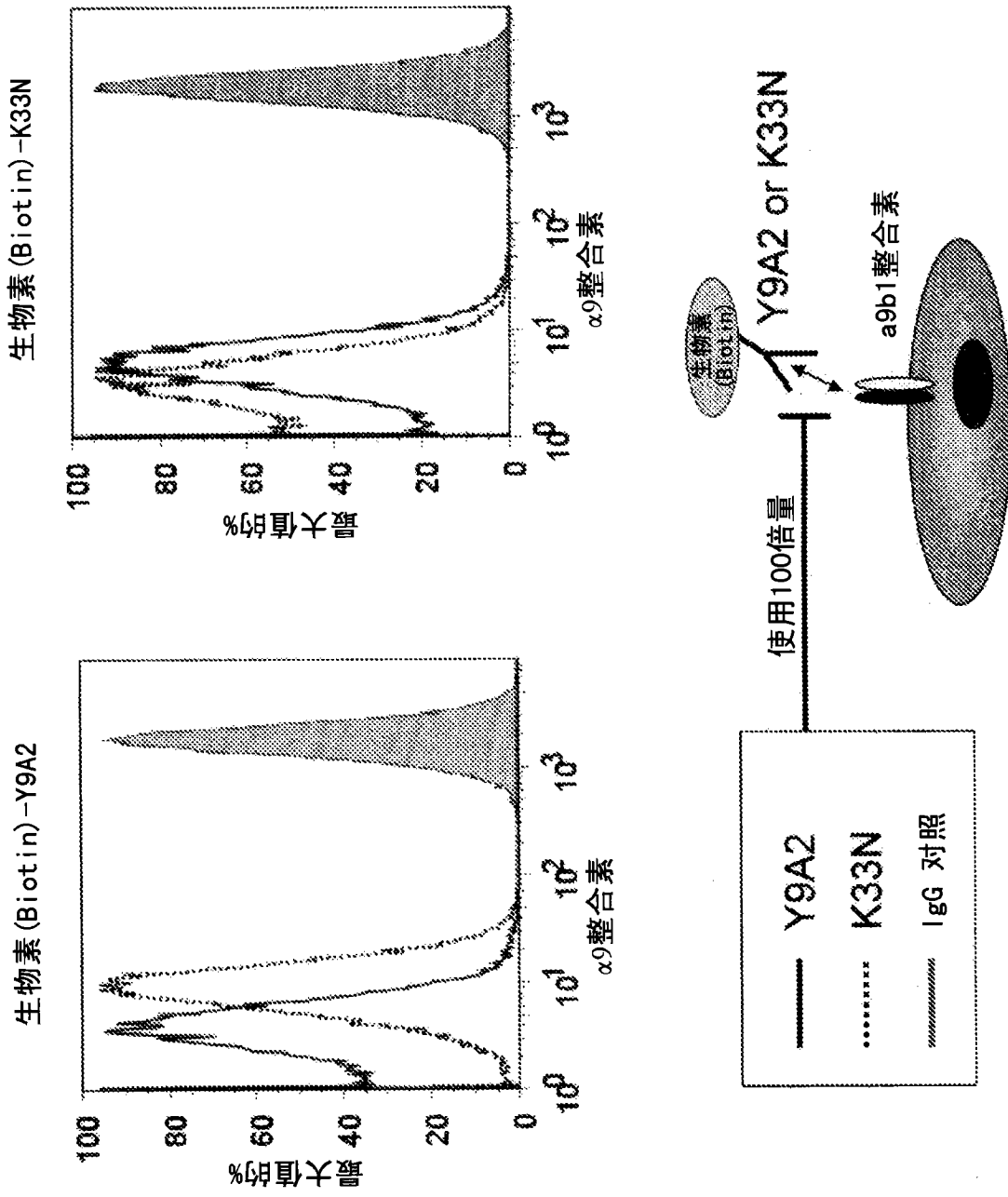


图 4

专利名称(译)	抗人α9整合素抗体及其用途		
公开(公告)号	CN102325796A	公开(公告)日	2012-01-18
申请号	CN200980157346.X	申请日	2009-02-23
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社遗传科技		
申请(专利权)人(译)	株式会社遗传科技		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社遗传科技		
[标]发明人	今重之 上出利光		
发明人	今重之 上出利光		
IPC分类号	C07K16/46 A61K39/395 A61P19/08 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/06 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	C07K2317/76 C07K16/2839 G01N2333/70546 A61P19/08 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00		
代理人(译)	张永康		
其他公开文献	CN102325796B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及抗人α9整合素抗体，更具体而言是特异性识别人α9整合素的单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体以及人抗体；产生上述单克隆抗体的杂交瘤细胞；上述单克隆抗体的制备方法；上述杂交瘤细胞的制备方法；含有上述抗人α9整合素抗体的治疗剂；含有上述抗人α9整合素抗体的诊断剂；抑制人α9整合素活性的化合物的筛选方法等。

抗人α9整合素抗体重链CDR

K33N

GTS 1: --VKLQESGPELVKPGASVKISCKASGYSFTSY~~YMN~~WVKRPGGGL~~EWIGW~~ 50
 JN Bio 1: QVQLQDSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTSY~~YMN~~WVKRPGGGL~~EWIGW~~ 50

GTS 51: IFPGSGNTKYNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQVSSLTSEDSAVYFCARSW 100
 JN Bio 51: IFPGSGNTKYNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQVSSLTSEDSAVYFCARSW 100

GTS 101: VSYERGYFDYWGQGTSLTVSS 122
 JN Bio 101: VSYERGYFDYWGQGTSLTVSS 122

M35A

GTS 1: VKLQESGTLVKPGASVRLSCKASGYTFTSY~~WIH~~WVKQSPGGGL~~EWIGE~~ 50
 Takara 1: VKLQESGTLVKPGASVRLSCKASGYTFTSY~~WIH~~WVKQSPGGGL~~EWIGE~~ 50

GTS 51: NPSSGRTNFIE~~N~~FETKATLTVDRSSTAYMQLT-SLTSEDSAVYFCARLAY 100
 Takara 51: NPSSGRTNFIE~~N~~FETKATLTVDRSSTAYMQLT-SLTSEDSAVYFCARLAY 100

GTS 101: GNYSW---FAYWGQGTSLTVSS 119
 Takara 101: GNYSW---FAYWGQGTSLTVSS 119