



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101506239 B

(45) 授权公告日 2012.07.25

(21) 申请号 200780026209.3

A61P 29/00(2006.01)

(22) 申请日 2007.07.11

A61P 31/00(2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 35/00(2006.01)

191836/2006 2006.07.12 JP

A61P 37/06(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

G01N 33/15(2006.01)

2009.01.12

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(86) PCT申请的申请数据

C12P 21/08(2006.01)

PCT/JP2007/064129 2007.07.11

(56) 对比文件

(87) PCT申请的公布数据

TW 200637575 A, 2006.11.01, 摘要, 实施例
3, 8 页第 8-22 行, 第 9 页第 11-16 行, 第 12 页
第 6-11 行.

W02008/007804 JA 2008.01.17

(73) 专利权人 株式会社遗传科技

地址 日本北海道

审查员 王慧

(72) 发明人 金山刚士 黑滝大翼 今重之

上出利光

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51) Int. Cl.

C07K 16/46(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 19/08(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 17 页

序列表 16 页 附图 10 页

(54) 发明名称

抗人 α 9 整联蛋白抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及特异性识别人 α 9 整联蛋白的抗体(尤其是单克隆抗体)、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体;产生前述单克隆抗体的杂交瘤细胞;前述单克隆抗体的制备方法;前述杂交瘤细胞的制备方法;含有前述抗人 α 9 整联蛋白抗体的治疗剂;含有前述抗人 α 9 整联蛋白抗体的诊断试剂;抑制人 α 9 整联蛋白的活性的化合物的筛选方法等。

1. 一种抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,其重链的互补性决定区域中的 CDRH1 为序列号 18 的氨基酸序列,CDRH2 为序列号 22 的氨基酸序列,CDRH3 为序列号 26 的氨基酸序列,轻链的互补性决定区域中的 CDRL1 为序列号 30 的氨基酸序列,CDRL2 为序列号 34 的氨基酸序列,CDRL3 为序列号 38 的氨基酸序列。

2. 一种抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,其由保藏号 FERM BP-10512 标示的杂交瘤细胞所产生。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,其抑制人 $\alpha 9$ 整联蛋白与 $\alpha 9$ 整联蛋白的配体的结合。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,其为单克隆抗体。

5. 根据权利要求 1 所述的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,其为嵌合抗体。

6. 根据权利要求 1 所述的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,其为人源化抗体。

7. 根据权利要求 1 所述的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,其为人抗体。

8. 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,其含有权利要求 1 或 2 所述的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体作为有效成分。

9. 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,其含有权利要求 1 或 2 所述的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体和抗人 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体两者作为有效成分。

10. 一种癌、炎症性疾病、传染病、自身免疫性疾病或骨病的诊断试剂,其含有权利要求 1 或 2 所述的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体作为有效成分。

抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及特异性识别人 $\alpha 9$ 整联蛋白的抗体（尤其是单克隆抗体）、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体 (human antibody)；产生前述单克隆抗体的杂交瘤细胞；前述单克隆抗体的制备方法；前述杂交瘤细胞的制备方法；含有前述抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的治疗剂；含有前述人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的诊断试剂；抑制人 $\alpha 9$ 整联蛋白的活性的化合物的筛选方法等。

背景技术

[0002] 生物体中，维持生命现象的最小功能单位为细胞，具有相同功能的细胞聚集在一起构成组织，各种组织聚集并协同而形成具有一定功能的器官，作为整体进行协调统一的生命活动。多数组织基本由细胞和胞外基质构成，通过黏附细胞和胞外基质的细胞-胞外基质间黏附、以及细胞间黏附而维持构造。就胞外基质而言，一直以来认为其没有生物活性，只是一种填充物，实际上，现已逐渐清楚其在几乎所有的组织中起重要的作用。现在已经了解了细胞和胞外基质间黏附活性，提示其不仅起细胞的立足点的作用，还与各种细胞功能的调节和维持组织、器官的恒常性有关，已认识到其重要性。

[0003] 连结细胞和胞外基质的黏附通过整联蛋白所代表的跨膜细胞黏附蛋白而进行。整联蛋白构成为 α 链和 β 链 1 : 1 的异二聚体，迄今为止已发现 18 种 α 链，8 种 β 链，已鉴定至少 24 种它们的组合。已知各整联蛋白分别识别特异的胞外基质（配体）。而且，还逐渐了解了含有整联蛋白的跨膜细胞黏附蛋白质的作用不仅在于细胞和胞外基质的黏附、固定，而且还将来自于胞外基质的信息转换为细胞内信号，承担细胞的增殖、运动、细胞死亡、分化等的调节。

[0004] 整联蛋白根据配体的特异性和功能被分类为亚家族，被分为胶原受体、层粘连蛋白受体、识别纤连蛋白和玻连蛋白等中包含的 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 (Hynes R.O. 2002. Integrins : Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. Cell 110 : 673-87 ; Miyasaka M. 2000. New edition of Adhesion Molecule handbook. Shujunsha.)。 $\alpha 4$ 和 $\alpha 9$ 整联蛋白是不属于上述任何一个的亚家族，被称为 $\alpha 4$ 整联蛋白亚家族 (Elise L. Palmer, Curzio R. Fieggen, Ronald Ferrando, Robert Pytela, Sheppard D. 1993. Sequence and Tissue Distribution of the Integrin $\alpha 9$ Subunit, a Novel Partner of $\beta 1$ That Is Widely Distributed in Epithelia and Muscle. The Journal of Cell Biology 123 : 1289-97)。

[0005] 作为胞外基质 (ECM) 一种的骨桥蛋白 (osteopontin ; 以下简称为 OPN) 是分子量约 41kDa 的分泌型磷酸化酸性糖蛋白，是在乳汁、尿、肾小管、破骨细胞、成骨细胞、巨噬细胞、活化 T 细胞、肿瘤组织等中可见到广泛表达的分子。分子中央部位具有细胞黏附序列 GRGDS，且在人 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 受体的整联蛋白黏附，通过 SVVYGLR 序列或 SLAYGLR 序列与 $\alpha 4(\alpha 4\beta 1)$ 和 $\alpha 9(\alpha 9\beta 1)$ 整联蛋白黏附。

[0006] 研究发现, $\alpha 4\beta 1$ 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, 二者存在这种模式上的差异(Y.Yokosaki et al., (1999)The Journal of Biological Chemistry 274, 36328-36334 ;P.M.Green et al., (2001)FEBS Letters 503, 75-79 ;S.T.Barry et al., (2000)Experimental Cell Research 258, 342-351)。 $\alpha 4$ 和 $\alpha 9$ 整联蛋白除了 OPN 以外还具有许多共同的配体。已知有纤连蛋白的 EDA 部位、前肽-冯维勒布兰德因子(pp-vWF)、组织型转谷氨酰胺酶(tTG)、第 XIII 凝血因子和血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)等。而且, 作为 $\alpha 4$ 整联蛋白特异性识别的配体, 已知有纤连蛋白的 CS-1 结构域、MadCAM-1($\alpha 4\beta 7$)等。作为 $\alpha 9$ 整联蛋白特异性识别的配体, 已知有腱生蛋白 C、纤溶酶等。

[0007] $\alpha 4$ 、 $\alpha 9$ 整联蛋白以及 $\beta 1$ 的整联蛋白亚单位的氨基酸序列是公知的, 登录在 GenBank 上。而且, 已知这些整联蛋白的氨基酸序列在种间相似性很高。

[0008] W002/081522 中公开了利用 OPN 缺失小鼠或使用 OPN 的中和抗体以抑制 OPN 功能时的类风湿关节炎、肝炎的治疗效果。而且, 在该公报中还公开了作为 $\alpha 4$ 整联蛋白、 $\alpha 9$ 整联蛋白的识别序列的 SVVYGLR 序列对于炎症性疾病发病十分重要, OPN 的受体在免疫活性细胞等中表达, 与炎症性疾病相关。

发明内容

[0009] 目前, 已知有许多种癌、炎症性疾病、传染病、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。

[0010] 因此, 本发明人着眼于整联蛋白、尤其是 $\alpha 9$ 整联蛋白, 进行了各种研究, 结果发现 $\alpha 9$ 整联蛋白的特异性抑制抗体具有癌抑制效果、抗炎效果, 从而完成本发明。也就是说, 具体而言, 本发明提供以下所述的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体, 产生其的细胞, 含有前述抗体的治疗剂, 抑制 $\alpha 9$ 整联蛋白活性的化合物的筛选方法等。

[0011] (1) 一种抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体, 其识别选自于序列号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 的氨基酸序列中的 1 个以上氨基酸序列。

[0012] (2) 一种抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体, 其重链的互补性决定区域(CDRH)中的 CDRH1 为序列号 16、17、18、19 或 41 的氨基酸序列, CDRH2 为序列号 20、21、22、23 或 42 的氨基酸序列, CDRH3 为序列号 24、25、26、27 或 43 的氨基酸序列, 轻链的互补性决定区域(CDRL)中的 CDRL1 为序列号 28、29、30、31 或 44 的氨基酸序列, CDRL2 为序列号 32、33、34、35 或 45 的氨基酸序列, CDRL3 为序列号 36、37、38、39 或 46 的氨基酸序列。

[0013] (3) 一种抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体, 其具有含有序列号 16、20、24、28、32 或 36 的氨基酸序列的互补性决定区域(CDR)中的至少一个。

[0014] (4) 一种抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体, 其具有含有序列号 16、20、24、28、32 或 36 的氨基酸序列的互补性决定区域(CDR)的全部。

[0015] (5) 一种抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体, 其具有含有序列号 17、21、25、29、33 或 37 的氨基酸序列的互补性决定区域(CDR)中的至少一个。

[0016] (6) 一种抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体, 其具有含有序列号 17、21、25、29、33 或 37 的氨基酸序列的互补性决定区域(CDR)的全部。

[0017] (7) 一种抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,其具有含有序列号 18、22、26、30、34 或 38 的氨基酸序列的互补性决定区域 (CDR) 中的至少一个。

[0018] (8) 一种抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,其具有含有序列号 18、22、26、30、34 或 38 的氨基酸序列的互补性决定区域 (CDR) 的全部。

[0019] (9) 一种抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,其具有含有序列号 19、23、27、31、35 或 39 的氨基酸序列的互补性决定区域 (CDR) 中的至少一个。

[0020] (10) 一种抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,其具有含有序列号 19、23、27、31、35 或 39 的氨基酸序列的互补性决定区域 (CDR) 的全部。

[0021] (11) 一种抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,其具有含有序列号 41、42、43、44、45 或 46 的氨基酸序列的互补性决定区域 (CDR) 中的至少一个。

[0022] (12) 一种抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,其具有含有序列号 41、42、43、44、45 或 46 的氨基酸序列的互补性决定区域 (CDR) 的全部。

[0023] (13) 根据上述 (1) ~ (12) 所述的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,其抑制人 $\alpha 9$ 整联蛋白与 $\alpha 9$ 整联蛋白的配体的结合。

[0024] (14) 根据上述 (1) ~ (13) 任意一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,其由保藏号 FERM BP-10510、FERM BP-10511、FERM BP-10512、FERM BP-10513 或 FERM BP-10832 标示的杂交瘤细胞所产生。

[0025] (15) 根据上述 (1) ~ (14) 任意一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,其为单克隆抗体。

[0026] (16) 根据上述 (1) ~ (13) 任意一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,其为嵌合抗体。

[0027] (17) 根据上述 (1) ~ (13) 任意一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,其为人源化抗体。

[0028] (18) 根据上述 (1) ~ (13) 任意一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,其为人抗体。

[0029] (19) 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,其含有上述 (1) ~ (18) 任意一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体作为有效成分。

[0030] (20) 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,其含有上述 (1) ~ (18) 任意一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体和抗人 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体两者作为有效成分。

[0031] (21) 一种癌、炎症性疾病、传染病、自身免疫性疾病或骨病的诊断试剂,其含有上述 (1) ~ (18) 任意一项所述的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体作为有效成分。

[0032] (22) 一种抑制 $\alpha 9$ 整联蛋白的活性的化合物的筛选方法,其特征在于,使用含有选自于序列号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 的氨基酸序列中的 1 个以上氨基酸序列的肽。

[0033] 发明效果

[0034] 本发明的抗体通过抑制 $\alpha 9$ 整联蛋白功能,来发挥对癌 (例如癌细胞的增殖、转移)、炎症性疾病 (例如关节风湿病、骨关节炎、肝炎、支气管哮喘、纤维症、糖尿病、动脉硬化、多发性硬化症、炎性肠病 (溃疡性结肠炎、克罗恩病))、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)等的治疗效果。而且,含有本发明的抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体和抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体两者的医药组合物发挥进一步改善的癌、炎症性疾病等的治疗效果。由于本发明的抗体可以在病理学上检测出 $\alpha 9$ 整联蛋白在细胞、组织中的表达,因此还可以作为诊断药使用。

附图说明

[0035] 图1(图1-1和1-2)是表示分析抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的互补性决定区域(CDR)的结果的图。

[0036] 图2是表示通过人 $\alpha 9$ 整联蛋白表达细胞研究抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体5个克隆的细胞黏附抑制效果的结果的图。

[0037] 图3是表示使抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体与抗人 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体共存时的癌细胞(人黑色素瘤细胞)的细胞黏附抑制效果的图。

[0038] 图4是表示抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体在风湿病病理模型中的风湿治疗效果的图。

[0039] 图5是表示通过小鼠关节炎模型研究抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的关节炎治疗效果的结果的图。

[0040] 图6表示由抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体产生的关节炎抑制的图像。

[0041] 图7是表示对抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体在关节炎发病后的治疗效果进行研究的结果的图。

[0042] 图8是表示为了研究抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体在关节炎发病后的治疗效果中的作用机制,通过PCR测定关节部位的细胞因子的变化量的研究结果的图。

[0043] 图9是表示为了研究小鼠关节炎模型中Th17的影响,测定小鼠腹股沟淋巴结的IL-17和ROR γ t的表达的结果的图。

具体实施方式

[0044] [发明的详细内容]

[0045] 2004年11月,Biogen Idec Inc.,(美国马萨诸塞州)和Elan Corporation(爱尔兰)的、作为 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体的Tysabri(注册商标)(natalizumab)作为多发性硬化症治疗药获得美国食品医药品局(FDA)批准。而且,Tysabri(注册商标)正以克罗恩病、类风湿关节炎等疾病为对象进行临床开发。另外,被称为P4C2的抗人 $\alpha 4\beta 1$ 整联蛋白单克隆抗体得到实验室水平的应用。

[0046] 但是, $\alpha 9$ 整联蛋白的抗体中,对人和豚鼠的 $\alpha 9$ 整联蛋白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)虽已供于实验用途但未用于临床。

[0047] 本发明中,通过注意以下方面并进一步开展,可以获得与人的 $\alpha 9$ 整联蛋白特异性反应的抗体。

[0048] (1) 人 $\alpha 9$ 整联蛋白过度表达株的制备

[0049] 为了制备 $\alpha 9$ 整联蛋白的抗体,向仓鼠的卵巢来源的细胞CHO-K1细胞导入基因,建立过度表达人 $\alpha 9$ 整联蛋白的细胞株,以该细胞作为抗原,免疫小鼠。

[0050] (2) 杂交瘤的筛选

[0051] 为了从通过细胞融合获得的各种杂交瘤中高效获得只与人 $\alpha 9$ 整联蛋白反应的克隆, 使用在 CHO-K1 细胞中表达同属于整联蛋白家族的人 $\alpha 4$ 整联蛋白的细胞, 选择出与其它整联蛋白不显示交叉反应性、与亲细胞 (CHO-K1) 的细胞表面抗原不反应的克隆, 由此有效地获得了与人 $\alpha 9$ 整联蛋白特异性反应的抑制抗体。

[0052] [本发明的抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体]

[0053] 本发明提供一种人 $\alpha 9$ 整联蛋白的单克隆抗体。本发明中, 所谓“抗体”是指可以与作为抗原的 $\alpha 9$ 整联蛋白或其部分肽结合的抗体分子整体或其片段 (例如、Fab、Fab'、F(ab')₂ 等片段), 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“抗体”包括嵌合抗体、人源化抗体、人抗体。

[0054] 本发明中, “单克隆抗体”是指对于抗原高度特异, 识别单一抗原的抗体。

[0055] 本发明中, 所谓“抗体片段”是指全长抗体的一部分, 其为抗原结合区或可变区。例如, 抗体片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段。这些抗体片段可以通过抗体的木瓜蛋白酶消化、胃蛋白酶消化等一般公知的方法制备。

[0056] 上述所谓“嵌合抗体”是指通过基因工程方法将本发明中获得的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白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”是指通过基因工程方法将本发明中获得的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的 H 链和 L 链的互补性决定区域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”是指使用导入了与人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)。

[0057] 更具体而言, 本发明首先提供了识别选自于序列号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 的氨基酸序列的 1 个以上氨基酸序列的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体。本发明的优选方式的抗体识别选自于序列号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 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 6 个氨基酸序列。本发明的优选抗体特异性识别如下的氨基酸序列: (1) 序列号 2、序列号 5、序列号 7、序列号 8、序列号 10、和序列号 11 的氨基酸序列; (2) 序列号 5; (3) 序列号 7; (4) 序列号 1、序列号 5、序列号 6、序列号 7 和序列号 13 的氨基酸序列; (5) 序列号 5、序列号 7、序列号 10 和序列号 13 的氨基酸序列; (6) 序列号 2、序列号 5、序列号 7、序列号 8 和序列号 15 的氨基酸序列; (7) 序列号 5、序列号 7、序列号 10 和序列号 13; (8) 序列号 11 的氨基酸序列。

[0058] 此外, 本发明的优选方式的抗体具有含有序列号 16、20、24、28、32 或 36 的氨基酸序列的互补性决定区域 (CDR) 中的至少一个。更优选的抗体是具有含有序列号 16、20、24、28、32 或 36 的氨基酸序列的互补性决定区域 (CDR) 中的 2 个以上、3 个以上、4 个以上、5 个以上或 6 个的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体, 特别优选的抗体含有如下的氨基酸序列: (1) 序列号 16、序列号 20、序列号 24 和序列号 36 的氨基酸序列; (2) 序列号 16、序列号 20 和序列号 24 的氨基酸序列; (3) 序列号 28、序列号 32 和序列号 36 的氨基酸序列; (4) 序列号 20 和序列号 24 的氨基酸序列; 或 (5) 序列号 24 和序列号 36 的氨基酸序列。

[0059] 此外, 本发明的其它方式的抗体具有含有序列号 17、21、25、29、33 或 37 的氨基酸序列的互补性决定区域 (CDR) 中的至少一个。更优选的抗体是具有含有序列号 17、21、25、29、33 或 37 的氨基酸序列的互补性决定区域 (CDR) 中的 2 个以上、3 个以上、4 个以上、5 个以上或 6 个的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体, 特别优选的抗体含有如下的氨基酸序列: (1) 序列号

17、序列号 21、序列号 25 和序列号 37 的氨基酸序列；(2) 序列号 17、序列号 21 和序列号 25 的氨基酸序列；(3) 序列号 29、序列号 33 和序列号 37 的氨基酸序列；(4) 序列号 21 和序列号 25 的氨基酸序列；或 (5) 序列号 25 和序列号 37 的氨基酸序列。

[0060] 此外,本发明的其它方式的抗体具有含有序列号 18、22、26、30、34 或 38 的氨基酸序列的互补性决定区域 (CDR) 中的至少一个。更优选的抗体是具有含有序列号 18、22、26、30、34 或 38 的氨基酸序列的互补性决定区域 (CDR) 中的 2 个以上、3 个以上、4 个以上、5 个以上或 6 个的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,特别优选的抗体含有如下的氨基酸序列:(1) 序列号 18、序列号 22、序列号 26 和序列号 38 的氨基酸序列;(2) 序列号 18、序列号 22 和序列号 26 的氨基酸序列;(3) 序列号 30、序列号 34 和序列号 38 的氨基酸序列;(4) 序列号 22 和序列号 26 的氨基酸序列;或 (5) 序列号 26 和序列号 38 的氨基酸序列。

[0061] 此外,本发明的其它方式的抗体具有含有序列号 19、23、27、31、35 或 39 的氨基酸序列的互补性决定区域 (CDR) 中的至少一个。更优选的抗体是具有含有序列号 19、23、27、31、35 或 39 的氨基酸序列的互补性决定区域 (CDR) 中的 2 个以上、3 个以上、4 个以上、5 个以上或 6 个的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,特别优选的抗体含有如下的氨基酸序列:(1) 序列号 19、序列号 23、序列号 27 和序列号 39 的氨基酸序列;(2) 序列号 19、序列号 23 和序列号 27 的氨基酸序列;(3) 序列号 31、序列号 35 和序列号 39 的氨基酸序列;(4) 序列号 23 和序列号 27 的氨基酸序列;或 (5) 序列号 27 和序列号 39 的氨基酸序列。

[0062] 此外,本发明的其它方式的抗体具有含有序列号 41、42、43、44、45 或 46 的氨基酸序列的互补性决定区域 (CDR) 中的至少一个。更优选的抗体是具有含有序列号 41、42、43、44、45 或 46 的氨基酸序列的互补性决定区域 (CDR) 中的 2 个以上、3 个以上、4 个以上、5 个以上或 6 个的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,特别优选的抗体含有如下的氨基酸序列:(1) 序列号 41、序列号 42、序列号 43 和序列号 46 的氨基酸序列;(2) 序列号 41、序列号 42 和序列号 43 的氨基酸序列;(3) 序列号 44、序列号 45 和序列号 46 的氨基酸序列;(4) 序列号 42 和序列号 43 的氨基酸序列;或 (5) 序列号 43 和序列号 46 的氨基酸序列。

[0063] 本发明中,特别优选的抗体是由保藏号 FERM BP-10510、FERM BP-10511、FERM BP-10512、FERM BP-10513 或 FERM BP-10832 标示的杂交瘤细胞所产生的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体。

[0064] 以下,对抗 $\alpha 9$ 整联蛋白单克隆抗体的制备进行详细说明,但该抗体的制备不限于此。

[0065] [$\alpha 9$ 整联蛋白 (抗原)]

[0066] 本发明中,作为抗原使用的 $\alpha 9$ 整联蛋白可以是:(1) 来源于人和其它哺乳动物的表达 $\alpha 9$ 整联蛋白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 $\alpha 9$ 整联蛋白的基因 DNA 优选 cDNA 导入细菌、酵母、动物细胞等细胞株中并使之表达的重组蛋白质;另外还可以是 (3) 合成蛋白质。

[0067] 此外,本发明的 $\alpha 9$ 整联蛋白还包括与各种哺乳动物的 $\alpha 9$ 整联蛋白的氨基酸序列、特别优选与人 $\alpha 9$ 整联蛋白的氨基酸序列 (序列号 :40) 具有基本相同的氨基酸序列的多肽。

[0068] 这里所谓的“具有基本相同的氨基酸序列的多肽”是指:只要是具有与天然型的 $\alpha 9$ 整联蛋白特别优选人来源的 $\alpha 9$ 整联蛋白基本相同的生物学性质即可,可以是具有该

氨基酸序列中的多个氨基酸、优选 1 至 10 个氨基酸、特别优选 1 至多个（例如 1 至 5 个、1 至 4 个、1 至 3 个、1 至 2 个）氨基酸被置换、缺失和 / 或被修饰的氨基酸序列的突变多肽和具有在该天然型的 $\alpha 9$ 整联蛋白特别优选在人来源的 $\alpha 9$ 整联蛋白的氨基酸序列中添加了多个氨基酸优选 1 至 10 个氨基酸、特别优选 1 至多个（例如 1 至 5 个、1 至 4 个、1 至 3 个、1 至 2 个）氨基酸的氨基酸序列的突变多肽。此外，还可以是具有这种置换、缺失、修饰和添加中的多个的突变多肽。

[0069] 本发明的 $\alpha 9$ 整联蛋白，尤其是人来源的 $\alpha 9$ 整联蛋白，除了基因重组技术外，还可以通过适当使用化学合成法，细胞培养法等本领域中公知的方法或其修饰方法来制备。

[0070] 而且，作为突变多肽的制备方法，可以例举例如合成寡核苷酸介导的点突变法（缺口双链 (gapped duplex) 法）、通过亚硝酸或亚硫酸处理随机地导入点突变的方法，通过 Ba131 酶等制备缺失突变体的方法、盒式突变 (cassette mutagenesis) 法、接头分区诱变法、错误掺入 (miss incorporation) 法、错配引物 (mismatch primer) 法、DNA 片段合成法等。

[0071] 此外，本发明的 $\alpha 9$ 整联蛋白还包括该 $\alpha 9$ 整联蛋白的“一部分”。这里所谓的“一部分”，是含有用于与 OPN、腱生蛋白-C、VCAM-1 等 $\alpha 9$ 整联蛋白配体结合所必需的区域的部分，具体是指含有序列号 :1 表示的氨基酸序列的第 29 位至第 980 位的部分。该 $\alpha 9$ 整联蛋白的“一部分”，还可以按照后述的本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，此外还可以通过蛋白质分解酶等将利用细胞培养法分离的 $\alpha 9$ 整联蛋白特别优选人来源的 $\alpha 9$ 整联蛋白适当切断来制造。

[0072] 作为抗原，还可以使用通过重组技术在细胞膜上过度表达 $\alpha 9$ 整联蛋白的细胞自身或其膜部分等。

[0073] 本发明的 $\alpha 9$ 整联蛋白还包括具有与人 $\alpha 9$ 整联蛋白的氨基酸序列（序列号 :40）基本相同的氨基酸序列的多肽。作为具有与序列号 :40 所示的氨基酸序列基本相同的氨基酸序列的多肽，具体可以例举具有序列号 :1 至 15 所示的氨基酸序列的人 $\alpha 9$ 整联蛋白。而且，在本发明中，优选使用通过重组技术在细胞膜上过度表达人 $\alpha 9$ 整联蛋白的细胞自身。因此，还存在后述的、用公知的基因工程技术克隆编码人 $\alpha 9$ 整联蛋白的基因（例如、cDNA），制备在细胞膜上过度表达人 $\alpha 9$ 整联蛋白的细胞自身或其细胞膜部分来作为抗原的情况。

[0074] [抗体产生细胞的制备]

[0075] 还可以将抗原自身单独地或与载体、稀释剂一起给予至通过对被免疫的动物给予而能够产生抗体的部位。在给予时为了提高抗体产生能力，还可以给予弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂。给予通常每 1 ~ 6 周进行 1 次，总计进行 2 ~ 10 次左右。作为使用的温血动物，可以例举例如小鼠、猴、兔、狗、豚鼠、大鼠、仓鼠、绵羊、山羊、鸡等，本发明中优选使用小鼠。

[0076] 治疗的对象是人且产生 $\alpha 9$ 整联蛋白抑制抗体的动物为小鼠时，最好使用人小鼠嵌合抗体或人源化抗体，此外最好使用导入了与抗体产生相关的人基因的小鼠等转基因动物制备的人单克隆抗体。

[0077] [抗体产生细胞和骨髓瘤细胞的细胞融合]

[0078] 作为骨髓瘤细胞，可以使用小鼠、大鼠、人等来源的细胞。例如小鼠骨髓瘤 P3U1、

P3X63-Ag8、P3X63-Ag8-U1、P3NS1-Ag4、SP2/0-Ag14、P3X63-Ag8-653 等, 优选抗体产生细胞与骨髓瘤细胞来源于同种动物, 特别优选来源于同系统 (same system) 的动物。骨髓瘤细胞可以冷冻保存, 或通过用添加了马、兔或胎牛血清的一般培养基进行传代而维持。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。

[0079] 作为使抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合而形成杂交瘤的方法, 可以例举使用聚乙二醇 (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 PEG 法的情况时, 可以以 1 ~ 10 : 1、优选 5 ~ 10 : 1 的混合比将脾细胞和骨髓瘤细胞悬浮于含有约 30 ~ 60% 的 PEG (平均分子量 1000 ~ 6000) 的适当的培养基或缓冲液中, 在温度为约 25 ~ 37°C, pH6 ~ 8 的条件下, 使之反应约 30 秒 ~ 3 分钟左右。反应结束后, 除去 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。

[0080] [杂交瘤细胞的挑选]

[0081] 产生单克隆抗体的杂交瘤细胞的挑选, 可以按照公知或基于公知方法的方法来进行。通常, 可以用添加了 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。作为挑选和育种用培养基, 可以使用杂交瘤细胞能够生长的任意一种培养基。例如, 可以使用含有 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)) 或杂交瘤培养用无血清培养基 (SFM-101、日水制药 (株)) 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。培养通常可以在 5% CO₂ 下进行。

[0082] 本发明的单克隆抗体的产生, 可以使用记载于科学评论社 1997 年的《新临床免疫实验操作法 (第 3 部)》的细胞 ELISA 法进行确认和筛选。如果预测在筛选时使用免疫所使用的细胞则背景变高、假阳性增多时, 可以将与不同于免疫中使用的细胞的细胞中过度表达的人 $\alpha 9$ 整联蛋白反应、且与过量表达 $\alpha 4$ 整联蛋白的细胞不反应的克隆作为抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体。对于这种克隆, 通过重复进行 1 至 5 次优选 2 至 4 次的有限稀释法, 可以制备单克隆抗体。

[0083] [抗体的分离纯化]

[0084] 获得的抗体可以进行纯化直至均匀。抗体的分离、纯化可使用通常蛋白质所使用的分离、纯化方法。例如, 适当选择组合亲合层析等层析柱、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), 但不限于此。作为在亲合层析中使用的柱, 可以例举蛋白 A 柱、蛋白 G 柱。例如, 作为使用蛋白 A 柱的柱, 可以例举 Hyper D, POROS, Sepharose F.F. (Amersham Biosciences) 等。

[0085] [抗体的标记]

[0086] 可以使用公知的方法或市售的试剂盒对获得的抗体进行各种标记 (例如生物素标记、FITC 标记、APC 标记)。本发明中优选使用采用生物素标记试剂盒 (Biotin Labeling Kit) (同仁化学) 的生物素标记。

[0087] 这样获得的单克隆抗体, 根据需要纯化后, 按照常规方法制剂化, 可以作为癌、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, 可以制成注射剂、点滴用剂等非口服制剂, 也可通过创意加工制成口服制剂来使用。而且, 当制剂化时, 在药事上和药学允许的范围, 可以使用与剂型相应的载体、

稀释剂或添加剂等。

[0088] [抗体的药理学效果]

[0089] 现在已逐渐了解整联蛋白的作用不仅在于细胞和胞外基质 (ECM) 的黏附, 固定, 还承担将来自于胞外基质的信息转换为细胞内信号, 承担细胞的增殖、运动、细胞死亡、分化等的调节。因此, 获得的单克隆抗体, 由于可以通过抑制 ECM 与 $\alpha 9$ 整联蛋白的结合来阻断来自于 ECM 的信息的细胞内信号传递, 因此可以治疗与 ECM 相关的疾病。作为与 $\alpha 9$ 整联蛋白结合的 ECM 和 $\alpha 9$ 配体, 已知有 OPN、纤连蛋白、前肽 - 冯维勒布兰德因子 (pp-vWF)、组织型转谷氨酰胺酶 (tTG)、第 X III 凝血因子、血管细胞黏附分子 -1 (VCAM-1)、腱生蛋白 C、纤溶酶等。使用这些 ECM 和表达 $\alpha 9$ 整联蛋白的细胞、癌细胞, 通过体外观察在获得的单克隆抗体存在下的结合抑制, 可以发现本发明的单克隆抗体的对象疾病。

[0090] 另一方面, 在使用抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体作为人的治疗用药品时, 确认其效果所必需的、临床前开发阶段中的体内的病理模型动物无法确认抗体对人的抗原的效果。也就是说, 在进行给予人以确认治疗效果的临床试验之前, 需要进行动物实验以确认对对象疾病的治疗效果。已知小鼠遗传背景已明确的系统较多, 可以观察与人基本相同的疾病的病理模型数量众多, 因此适于作为实验动物。但是, 一般而言, 抗体药物是针对人的抗原的抗体, 很少与小鼠的同一对象抗原呈现交差反应, 通过制备针对小鼠的对象抗原的抗体, 使用其进行动物实验, 可以观察人使用抗体的药理效果、推测用作临床试验的给药量、与对象抗原以外的反应性、副作用的发生等, 可以反映在人中的作用。具体而言, 通过对病理模型小鼠给予抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体, 可明确抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的对象疾病。

[0091] [含有抗体的药物]

[0092] 以本发明的抗体 (尤其是单克隆抗体) 作为有效成分的制剂, 可以用作癌例如癌细胞的增殖、转移, 炎症性疾病 (例如关节风湿病、骨关节炎、肝炎、支气管哮喘、纤维症、糖尿病、动脉硬化、多发性硬化症、炎性肠病 (溃疡性结肠炎、克罗恩病))、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。其中, 所谓“治疗”这一术语包括“预防”这一含义。

[0093] 给药量根据给予对象、对象疾病、症状、给予途径等而不同, 例如在用于癌患者的预防和 / 或治疗时, 本发明的抗体通常适合以 0.01 ~ 20mg/kg 体重左右、优选 0.1 ~ 10mg/kg 体重左右、更优选 0.1 ~ 5mg/kg 体重左右作为 1 次量, 1 个月 1 ~ 10 次左右、优选 1 个月 1 ~ 5 次左右通过静脉注射进行给予。在其它非经口给药和经口给药时可以按照此量给予。在症状特别严重时, 还可以根据症状加量或增加给予次数。

[0094] 本发明的抗体可以直接或作为适当的医药组合物进行给予。上述给予时使用的医药组合物包括上述抗体或其盐、药理学上允许的载体、稀释剂或赋形剂。这种组合物可以以适于非经口给药或经口服药的剂型来提供。

[0095] 也就是说, 作为用于非经口服药的组合物, 可以使用例如注射剂、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例如通过用通常注射剂中所使用的无菌的水性或油性液将上述抗体或其盐溶解、悬浮或乳化来制备。作为注射用的水性液, 可以使用例如生理盐水, 含有葡萄糖、蔗糖、甘露糖醇、其它辅助药的等渗溶液等, 还可以一起使用适当的增溶剂, 例如醇

(例如乙醇)、多元醇(例如丙二醇、聚乙二醇)、非离子型表面活性剂(例如聚山梨醇酯 80、聚山梨醇酯 20、HCO-50(氢化蓖麻油的聚氧化乙烯(50mol)加合物))等。作为油性液,可以使用例如芝麻油、大豆油等,还可以同时使用苯甲酸苄酯、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。直肠给予时使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,由于抗体等蛋白质在经口给药时一般被消化器官分解,因此难以经口给药,但是通过在抗体片段或经修饰的抗体片段和剂型方面下功夫,也有经口给药的可能性。

[0096] 上述的非口服用医药组合物,适合制备成与活性成分的给药量相应的给药单位的剂型。作为这种给药单位的剂型,可以例举注射剂(安瓿、小瓶(vial)、预充式注射器)、滴鼻剂、栓剂等,不同的每一给药单位剂型通常含有 5 ~ 500mg,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。

[0097] 此外,前述各组合物只要是与上述抗体配合不产生不好的相互作用,就可以含有其它活性成分。例如,本发明的药物制剂除了上述抗体之外,还可以含有抗人 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体。此时的混合比例没有特别的限制,例如,可以将抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体:抗人 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体的比率在 1 ~ 99 : 99 ~ 1 的比率的范围内进行调整。

[0098] [含有本发明的单克隆抗体的诊断试剂]

[0099] 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、肉芽肿等的诊断试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·结节病等自身免疫疾病的诊断试剂。本发明的单克隆抗体由于能够特异性识别 $\alpha 9$ 整联蛋白,因此可以用于待测液中的 $\alpha 9$ 整联蛋白的定量、尤其是通过夹层免疫测定法、竞争法、免疫测量法(immunometric)或散色比浊法(nephrometry)等进行的定量等。当这些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、操作方法基础上再加上本领域技术人员通常的技术性考虑来构建 LLPL 或其盐的测定系统。这些常规技术手段的详细内容,可以参照总论、现有书籍等。

[0100] 如上所述,通过使用本发明的抗体,可以高敏感度地定量 $\alpha 9$ 整联蛋白。此外,通过利用使用本发明的抗体的、生物体内的 $\alpha 9$ 整联蛋白的定量方法,可以进行与 $\alpha 9$ 整联蛋白相关的各种疾病的诊断。例如,在检测到 $\alpha 9$ 整联蛋白浓度的增减时,可以诊断为与 $\alpha 9$ 整联蛋白相关的疾病、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。而且,本发明的单克隆抗体可用于特异性检测存在于体液、组织等待测对象中的 $\alpha 9$ 整联蛋白。而且,还可以在用于纯化 $\alpha 9$ 整联蛋白的抗体柱的制备、包含于纯化时的各成分中的 $\alpha 9$ 整联蛋白的检测、待测细胞内 $\alpha 9$ 整联蛋白的行为的分析等中使用。

[0101] [抑制人 $\alpha 9$ 整联蛋白活性的化合物的筛选方法]

[0102] 通过利用本发明的抗体所识别的人 $\alpha 9$ 整联蛋白上的表位,可以筛选抑制人 $\alpha 9$ 整联蛋白活性的化合物。具体而言,本发明提供一种抑制人 $\alpha 9$ 整联蛋白活性的低分子化合物的筛选方法,其特征在于,使用含有选自于序列号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 的氨基酸序列中的 1 个以上氨基酸序列的多肽(以下,称为“肽 A”)。

[0103] 作为肽 A,优选具有选自于序列号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 的氨

氨基酸序列中的 2 个以上、3 个以上、4 个以上、5 个以上、6 个以上、7 个以上、或 8 个氨基酸序列。肽 A 可以通过公知的合成法进行合成。更优选的肽 A 含有如下的氨基酸序列：(1) 序列号 2、序列号 5、序列号 7、序列号 8、序列号 9、序列号 10、序列号 11 和序列号 12 的氨基酸序列；(2) 序列号 5、序列号 7、序列号 8 和序列号 11 的氨基酸序列；(3) 序列号 2、序列号 3、序列号 5、序列号 8、序列号 9、序列号 11、序列号 12 和序列号 14 的氨基酸序列；(4) 序列号 5、序列号 7、序列号 10、序列号 13 和序列号 14 的氨基酸序列；(5) 序列号 1、序列号 5、序列号 6、序列号 7 和序列号 13 的氨基酸序列；(6) 序列号 10 和序列号 13 的氨基酸序列或 (7) 序列号 5 和序列号 7 的氨基酸序列。

[0104] 在本发明的筛选方法中，例如，将 (i) 使肽 A 与人 $\alpha 9$ 整联蛋白的配体（例如、腱生蛋白 C、纤溶酶等）接触的情况与 (ii) 使肽 A 与配体和试验化合物接触的情况进行比较。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。为了容易地进行这种结合量的比较，优选使用已通过公知的方法标记的配体。对于通过这种方法获得的候选化合物，对是否抑制人 $\alpha 9$ 整联蛋白活性进行确认实验，从而获得抑制人 $\alpha 9$ 整联蛋白活性的化合物。

[0105] 其中，作为待测物质，可以使用多肽、蛋白质、生物体来源的非肽化合物、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，可以是新化合物，也可以是公知的化合物。

[0106] 所选择的化合物与本发明的抗体一样，可作为癌、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。

[0107] 实施例

[0108] 以下通过实施例对本发明进行更为详细的说明，但这并不限定本发明的范围。

[0109] （实施例 1）

[0110] [人 $\alpha 9$ 整联蛋白的抗体的制备]

[0111] 人 $\alpha 9$ 整联蛋白的抗体的制备，通过参考消减免疫 (Subtractive Immunization) 法 (Williams C. V., Stechmann C. L., McLoon S. C., Biotechniques. (1992) 12 :842-847)，对 3 只 BALB/c 小鼠进行免疫。首先，将 CHO-K 1 细胞以 4×10^6 个细胞 / 只进行腹腔内给予，次日和第三天将环磷酰胺以 4mg / 只进行腹腔内给予。环磷酰胺给予 2 周后，将人 $\alpha 9$ 整联蛋白表达细胞（人 $\alpha 9$ /CHO-K1 细胞）以 2×10^6 个细胞 / 只进行腹腔内给予，再于其 2 周后，将人 $\alpha 9$ /CHO-K1 细胞以 3×10^6 个细胞 / 只进行腹腔内给予。将与人 $\alpha 9$ /CHO-K1 细胞反应且不与表达人 $\alpha 4$ 整联蛋白的 CHO-K1 细胞反应的克隆作为抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体。其结果为，建立了产生抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的杂交瘤细胞的 5 个克隆 (1K11、21C5、24I11、25B6、28S1)。

[0112] 这里获得的杂交瘤细胞 1K11、21C5、24I11 和 25B6 于 2006 年 2 月 15 日、28S1 于 2007 年 5 月 29 日分别以保藏号 FERM BP-10510、10511、10512、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专利生物保藏中心。

[0113] （实施例 2）

[0114] [抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的表位分析]

[0115] 对于自人 $\alpha 9$ 整联蛋白的 N 末端起第 1-12 位的氨基酸序列的肽、第 4-15 位的氨

氨基酸序列的肽、第 7-18 位的氨基酸序列的肽这样的依次向 C 末端方向移动 3 个氨基酸且由 12 个氨基酸构成的肽, 将其在配置了 C6 间隔段后, 再结合了 2 个 β Ala 的纤维素膜上配制成 5nmol/ 斑点。用封闭缓冲液 (牛奶 /0.05% Tween20, PBS) 封闭膜之后, 室温下将膜在 10mL1.0 μ g/mL 基于常规方法制备的过氧化物酶标记抗人 α 9 整联蛋白抗体 (1K11、21C5、24I11 和 25B6) 溶液中浸渍 3 小时。用洗涤液 (T-TBS) 洗膜之后, 用 ECL 检测试剂在室温下反应 1 分钟。观察酶反应生成物的荧光, 根据荧光强度鉴定表位。此外, 作为对照的抗人 α 9 整联蛋白抗体使用市售的 Y9A2。

[0116] 如下表 1 所示, 1K11 识别人 α 9 整联蛋白的氨基酸序列: 序列号 40 中的第 79 位 -96 位 (序列号 2)、第 160 位 -177 位 (序列号 5)、第 238 位 -252 位 (序列号 7)、第 277 位 -294 位 (序列号 8)、第 454 位 -471 位 (序列号 10) 和第 556 位 -573 位 (序列号 11), 21C5 识别第 79 位 -96 位 (序列号 2)、第 124-141 位 (序列号 3)、第 160 位 -177 位 (序列号 5)、第 238 位 -252 位 (序列号 7)、第 277 位 -294 位 (序列号 8)、第 409 位 -432 位 (序列号 9)、第 454 位 -471 位 (序列号 10)、第 556 位 -573 位 (序列号 11)、第 592 位 -621 位 (序列号 12)、第 706 位 -723 位 (序列号 14) 和第 931 位 -951 位 (序列号 15), 24I11 识别第 79 位 -96 位 (序列号 2)、第 142 位 -156 位 (序列号 4)、第 160 位 -177 位 (序列号 5)、第 238 位 -252 位 (序列号 7)、第 277 位 -294 位 (序列号 8)、第 556 位 -573 位 (序列号 11)、第 706 位 -723 位 (序列号 14) 和第 931 位 -951 位 (序列号 15), 25B6 识别第 40 位 -51 位 (序列号 1)、第 160 位 -177 位 (序列号 5)、第 208 位 -225 位 (序列号 6)、第 238 位 -252 位 (序列号 7) 和第 646 位 -657 位 (序列号 13), 这提示这些抗体并不是识别一部分的肽, 而是识别立体结构。另外, 本发明中获得的抗人 α 9 整联蛋白抗体与作为对照的 Y9A2 发生反应的肽不同, 因此可以说是识别与 Y9A2 不同表位的抗体。

[0117] 表 1

[0118] 表位作图的结果

[0119]

	1K11	21C5	24I11	25B6	Y9A2
FQGPADSFFGYA (序列号 1)	-	-	-	++	-
KSPGAVFKCRVHTNPDRR (序列号 2)	++	+++	++++	-	+
WMGVSLARQPKADGRVLA (序列号 3)	+	+++	+	-	+
CAHRWKNIYYEADHI (序列号 4)	+	+	+++	+	+
GFCYIIPSNLQAKGRTL (序列号 5)	+++	+++++	+++++	+++++	+++++
VMGAPGSFYWAGTIKVLN (序列号 6)	+	+	+	+++	+

VIMNRRYTYLGYAVT (序列号 7)	+++++	++	+++++	+++++	+++
VYIFRADRRSGTLIKIFQ (序列号 8)	++++	+++++	+++	-	+
QYSMKLSGQKINPVLRMFGQSISG (序列号 9)	+	++++	-	-	+
VVLLRARPVITVDVSIFL (序列号 10)	++	++	-	-	+++++
RHYVAHVKRRVQDVISPI (序列号 11)	+++	+++	+++++	+	++
ELPPLTPVLRWKKGQKIAQKNQTVFERNCR (序列号 12)	+	+++++	+	-	++
YLALGAVKNISL (序列号 13)	+	+	-	++	+++++
CSVGFPFMRSSKYEFSV (序列号 14)	+	++	++	-	+++
SSSVIQFMSRAKVKVDPALRV (序列号 15)	+	++	+++	-	+

[0120] (实施例 3)

[0121] [抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的互补性决定区域 (CDR) 的分析]

[0122] 从产生人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体 (1K11、21C5、24I11、25B6、28S1) 的杂交瘤中提取 mRNA, 通过逆转录制备 cDNA。以该 cDNA 作为模板, 使用 ScFv 克隆用引物 (Light Primer Mix、Heavy Primer Mix ; Amersham Biosciences 公司) 进行 PCR, 对抗体的重链和轻链的可变区分别进行延伸和扩增。然后, 基于常规方法将 PCR 产物插入 pCR II TOPO 载体中。对其进行测序, 确定氨基酸序列。对于各个抗体各进行 3 次上述操作。

[0123] 如图 1 所示, 可判断出 1K11 重链的 CDR 由 DYNMD (序列号 16)、DINPNNGGTIYNQKFQG (序列号 20) 和 SGVISTDY (序列号 24) 构成, 其轻链的 CDR 由 RASQEISGYLI (序列号 28)、AASTLDS (序列号 32) 和 YANYPP (序列号 36) 构成, 21C5 重链的 CDR 由 DYYMY (序列号 17)、TISDGGNYTYYPDSVKG (序列号 21) 和 DRDGSSLFAY (序列号 25) 构成, 其轻链的 CDR 由 KASQDVNIAVA (序列号 29)、WASTRHT (序列号 33) 和 HYNTPW (序列号 37) 构成, 24I11 重链的 CDR 由 DTYVH (序列号 18)、NIDPANGNTKYDPKFQG (序列号 22) 和 WLRHFYAMDY (序列号 26) 构成, 其轻链的 CDR 由 RASENIYYSLA (序列号 30)、NANSLED (序列号 34) 和 AYDVPY (序列号 38) 构成, 25B6 重链的 CDR 由 SYGVH (序列号 19)、VIWSGGSTNYNSALMS (序列号 23) 和 DYGNYPFAY (序列号 27) 构成, 其轻链的 CDR 由 KASQDVNTAVA (序列号 31)、SASYRYT (序列号 35) 和 HYSTPC (序列号 39) 构成, 28S1 重链的 CDR 由 GYGVN (序列号 41)、MIWGDGITEYNSALKSR (序列号 42) 和 DASSGYGFAY (序列号 43) 构

成,其轻链的 CDR 由 TASSVSSSYLH(序列号 44)、STSNLAS(序列号 45) 和 YHRSPY(序列号 46) 构成。

[0124] 为了参考,将 CDR 和序列号的对应示于表 2。

[0125] 表 2

[0126] CDR 和序列号的对应表

[0127]

	1k11	21C5	24I11	25B6	28S1
CDRH1	16	17	18	19	41
CDRH2	20	21	22	23	42
CDRH3	24	25	26	27	43
CDRL1	28	29	30	31	44
CDRL2	32	33	34	35	45
CDRL3	36	37	38	39	46

[0128] (实施例 4)

[0129] [抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的细胞黏附抑制效果]

[0130] 细胞黏附时,由于 $\alpha 9$ 整联蛋白与包含 OPN、纤连蛋白、腱生蛋白 C、VCAM-1 等的胞外基质 (ECM) 的 $\alpha 9$ 配体结合,因此对能够成为获得的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体抑制细胞黏附时的对象的胞外基质进行了研究。

[0131] hOPN(RAA)N-half 是将人 OPN 的 GRD 序列变化为 RAA 序列,将直至凝血酶酶切部位的 N 末端区域以 GST 融合蛋白的形式从大肠杆菌中纯化出来,用精确蛋白酶 (PrecisionProtease) (Amersham Biosciences 公司) 切断 GST 并除去而获得的蛋白质。VCAM-1 由 R&D Systems 公司获得。腱生蛋白 C 使用的是针对 $\alpha 9$ 整联蛋白的腱生蛋白 C 黏附序列区域的 AEIDGIEL 肽,而人纤连蛋白使用的是:合成作为对于与 $\alpha 9$ 整联蛋白的黏附十分重要的 EDA 区域内部分肽的 CPEDGIHELFP 肽后,使之与 BSA 结合的物质。作为人 $\alpha 9$ 整联蛋白高表达细胞,使用表达人 $\alpha 9$ 整联蛋白的 CHO-K1 细胞 (人 $\alpha 9$ /CHO-K1)。

[0132] 将各 $50 \mu\text{l}$ 的 $1.25 \sim 5.0 \mu\text{g/mL}$ 的腱生蛋白 C、纤连蛋白、VCAM-1 或 hOPN(RAA)N-half 添加于 96 孔板中,于 37°C 静置 1 小时,以此进行固定。用封闭液 (0.5% BSA/PBS) 封闭后,用 PBS 洗 1 次,然后将悬浮于添加了 0.25% BSA 的 D-MEM 的人 $\alpha 9$ /CHO-K1 细胞与获得的单克隆抗体混合,分别添加 $200 \mu\text{l}$ 使得细胞达到 1.0×10^5 个 /ml、抗体浓度达到 $10 \mu\text{g/mL}$ 。于 37°C 、5% CO_2 下反应 1 小时后,在孔中各添加 $50 \mu\text{l}$ 的 0.5% 结晶紫 (WAKO, Osaka, Japan)/20% 甲醇溶液,于室温下放置 30 分钟,以此进行细胞的固定和染色。用蒸馏水洗板后,用 20% 醋酸溶液转溶,测定 590nm 处的吸光度。另外,使用人骨桥蛋白的单克隆抗体 (5A1) 作为阴性对照,使用市售的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体 Y9A2 作为阳性对照。

[0133] 其结果示于图 2。与腱生蛋白 C 相关的细胞黏附受 21C5、24I11、25B6 和 28S1 抑制,但不受 1K11 抑制。观察到与纤连蛋白相关的细胞黏附受 21C5、25B6 和 28S1 抑制,受到

24I11 的少许抑制,但不受 1K11 抑制。观察到与 VCAM-1 相关的细胞黏附受到 21C5、24I11、25B6 和 28S1 抑制,但不受 1K11 抑制。与 hOPN(RAA)N-half 相关的细胞黏附受到 21C5、24I11、25B6 和 28S1 抑制,但不受 1K11 抑制。

[0134] (实施例 5)

[0135] [在抗人 α 4 整联蛋白抗体和抗人 α 9 整联蛋白抗体共存下的细胞黏附抑制效果]

[0136] α 4 和 α 9 整联蛋白与很多共同的 ECM 结合。因此,由于存在针对这两种整联蛋白的抗体,可认为细胞黏附抑制效果增强。于是,为了在体外调查抗人 α 4 整联蛋白抗体和抗人 α 9 整联蛋白抗体共存下的癌转移抑制效果,研究了两种抗体对表达 α 4 整联蛋白和 α 9 整联蛋白的癌细胞的、人黑色素瘤细胞 (G361) 与 ECM 的黏附的影响。

[0137] 使用 VCAM-1 (1.25 μ g/mL) 作为 ECM,抗人 α 4 整联蛋白抗体使用 P1H4,与实施例 4 同样进行。

[0138] 其结果示于图 3。与 VCAM-1 相关的细胞黏附完全不受抗体抑制,但一旦抗人 α 4 整联蛋白抗体共存,则可发现阳性对照 (Y9A2),21C5 和 24I11 受到抑制。由于许多表达 α 9 整联蛋白的细胞也表达 α 4 整联蛋白,提示通过一起使用抗人 α 4 整联蛋白抗体和抗人 α 9 整联蛋白抗体可以抑制细胞黏附,从而可以期待对抑制包括癌浸润在内的许多疾病具有增强效果。

[0139] (实施例 6)

[0140] [抗小鼠 α 9 整联蛋白抗体的抗风湿效果]

[0141] 对于 7 周大的雌性小鼠 (Balb/c) 各 3 只,以 400 μ g/ 只在腹腔内分别给予抗小鼠 α 9 整联蛋白抗体 (55A2C),作为对照给予正常仓鼠 IgG (以后简称为 NHG)。24 小时后,以 2mg/ 小鼠静脉给予用于引起关节炎的 II 型胶原单克隆抗体混合物 (Chondrex 公司)。在给予 II 型胶原单克隆抗体混合物起 72 小时后,再以 400 μ g/ 只在腹腔内给予 55A2C 或 NHG。同时,以 50 μ g/ 只在腹腔内给予 LPS。从 LPS 给予前 3 天至 LPS 给予后第 6 天观察小鼠,按照 Wood 的方法 (F. D. Wood, C. M. Pearson, A Tanaka, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 35, 456 (1969)), 对关节炎的程度评分,记录分数。

[0142] 其结果示于图 4。用对照的 NHG 的分数上升,观察到风湿发病,这提示抗小鼠 α 9 整联蛋白抗体完全抑制风湿发病。因此,可知抗 α 9 整联蛋白抗体具有抑制风湿发病和恶化的治疗效果。

[0143] (实施例 7)

[0144] [抗小鼠 α 9 整联蛋白抗体的关节炎治疗效果]

[0145] 以往,认为控制免疫系统的辅助性 T 细胞大致分为 Th1 和 Th2,但是最近了解到存在 Th17 细胞和抑制性 T 细胞等。而且,还了解到只有通过白介素 (IL)-23 而增加的 Th17 细胞具有增加破骨细胞的作用。Th 17 细胞通过产生 IL-17,在引起周围细胞的炎症的同时增加破骨细胞分化因子 RANKL (receptor of activator of NF- κ B ligand),因此形成容易产生破骨细胞的环境。此外,据报道,由于 IL-23、17 的基因被破坏的小鼠不会产生炎性骨破坏,因此这些因子对骨破坏起重要的作用。因此,为了调查抗 α 9 整联蛋白抗体对 Th17 的影响,用小鼠的关节炎模型和抗小鼠 α 9 整联蛋白抗体进行研究。

[0146] 对于 6 周龄的雌性小鼠 (Balb/c) 各 3 只,以 400 μ g/ 只在腹腔内分别给予抗小

鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体 (18R18D、55A2C), 作为对照给予正常仓鼠 IgG(以后简称为 NHG)。18R18D 是不具有细胞黏附抑制能力的抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体, 55A2C 是具有细胞黏附抑制能力的抗体。24 小时后以 2mg/ 小鼠静脉给予用于引起关节炎的 II 型胶原单克隆抗体混合物 (Chondrex 公司)。自给予 II 型胶原单克隆抗体混合物 72 小时后, 再次以 400 μ g/ 只在腹腔内给予 55A2C 或 NHG。同时, 以 50 μ g/ 只腹腔内给予 LPS。从 LPS 给予前 3 天至 LPS 给予后第 6 天观察小鼠, 按照 Wood 的方法 (F. D. Wood, C. M. Pearson, A. Tanaka, *Int. Arch. Allergy* pp1. *Immunol.* 35, 456 (1969)), 也就是说使用“0 : 无症状, 1 : 四肢的趾等小关节只有一根肿胀发红, 2 : 小关节 2 根以上、或手腕或脚腕等比较大的关节肿胀发红, 3 : 1 只手或脚整体肿胀发红, 4 : 1 只手或脚整体进一步肿胀达到最大限度”的评价项目, 对关节炎的程度评分, 记录分数。

[0147] 结果示于图 5。NHG 和 18R18D 的分数上升, 观察到关节炎发病, 可知关节炎发病受到抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体 55A2C 强烈的抑制。还可知抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体除了具有关节炎的发病预防效果, 还具有抑制恶化的效果。而且, 抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体所产生的关节炎抑制图像示于图 6。可知在 LPS 给予后第 6 天, 由于给予 55A2C 抑制了关节的肿胀。

[0148] 然后, 研究了抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的关节炎发病后的治疗效果。以 2mg/ 小鼠静脉给予用于引起关节炎的 II 型胶原单克隆抗体混合物 (Chondrex 公司), 72 小时后以 50 μ g/ 只腹腔内给予 LPS。其 3 天后, 腹腔给予 (400 μ g/ 只) 55A2C 或 NHG, 调查得分。其结果如图 7 所示, 可知即使在关节炎发病后给予抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体, 也有关节炎的治疗效果。

[0149] 根据以上所述, 提示抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体不仅对关节炎具有发病预防效果, 还具有发病后的治疗效果, 因此对其作用机制进行研究。对关节炎发病小鼠给予抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体后, 通过实时 PCR 测定手足关节病变部位的细胞因子 (IL-6, TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 和 TGF- β) 的变化量。其结果为, 通过将 55A2C 给予组与 NHG 给予组进行比较, IL-6、IL-1 β 和 TGF- α 的 mRNA 的表达显著地受到抑制 (图 8)。据报道, 这些细胞因子对于 Th17 的分化很重要, 可以推测抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体产生的关节炎抑制效果是源于通过 $\alpha 9$ 整联蛋白功能的抑制来抑制对 Th17 的分化很重要的细胞因子的产生。

[0150] 另一方面, 为了调查本关节炎模型中 Th17 的影响, 测定正常小鼠和 LPS 给予后第 1 天、第 3 天、第 6 天的小鼠 (BALB/c、6 周龄、雌性) 的小鼠腹股沟淋巴结的 IL-17 和 ROR γ t (视黄酸相关孤儿受体 γ t (retinoic acid-related orphan receptor γ t): 核内受体, 与 Th17 分化相关的转录因子) 的表达。其结果为, 随着关节炎恶化, IL-17、ROR γ t 的 mRNA 的表达显著提高, 由此提示本关节炎模型中的 Th17 的影响 (图 9)。因此, 为了研究由抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体产生的 $\alpha 9$ 整联蛋白的功能抑制对 Th17 的分化的影响, 在抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体给予后, 通过实时 PCR 测定手足关节病变部位的 IL-17 和 ROR γ t 表达量。如图 8 所示, 二者的表达被抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体显著抑制。也就是说, 可知抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体抑制 Th17 的分化。

[0151] 工业上利用的可能性

[0152] 本发明的抗体, 通过 $\alpha 9$ 整联蛋白功能抑制, 对癌 (例如癌细胞的增殖、转移)、炎症性疾病 (例如关节风湿病、骨关节炎、肝炎、支气管哮喘、纤维症、糖尿病、动脉硬化、多发性硬化症、炎性肠病 (溃疡性结肠炎、克罗恩病))、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)等的治疗效果。而且,含有本发明的抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体和抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体这两者的药物组合物起到进一步改善的癌、炎症性疾病等的治疗效果。本发明的抗体可以在病理学上检测细胞和组织中 $\alpha 9$ 整联蛋白的表达,因此还可以作为诊断药来使用。

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>3

Trp Met Gly Val Ser Leu Ala Arg Gln Pro Lys Ala Asp Gly Arg Val
 1 5 10 15
 Leu Ala

<210>4

<211>15

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>4

Cys Ala His Arg Trp Lys Asn Ile Tyr Tyr Glu Ala Asp His Ile
 1 5 10 15

<210>5

<211>18

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>5

Gly Phe Cys Tyr Ile Ile Pro Ser Asn Leu Gln Ala Lys Gly Arg Thr
 1 5 10 15
 Leu Ile

<210>6

<211>18

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>6

Val Met Gly Ala Pro Gly Ser Phe Tyr Trp Ala Gly Thr Ile Lys Val
 1 5 10 15
 Leu Asn

<210>7

<211>15

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>7

Val	Ile	Met	Asn	Arg	Arg	Tyr	Thr	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Ala	Val	Thr
1			5						10					15

<210>8

<211>18

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>8

Val	Tyr	Ile	Phe	Arg	Ala	Asp	Arg	Arg	Ser	Gly	Thr	Leu	Ile	Lys	Ile
1			5						10					15	
Phe Gln															

<210>9

<211>24

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>9

Gln	Tyr	Ser	Met	Lys	Leu	Ser	Gly	Gln	Lys	Ile	Asn	Pro	Val	Leu	Arg
1			5						10					15	
Met Phe Gly Gln Ser Ile Ser Gly															
20															

<210>10

<211>18

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>10

Val Val Leu Leu Arg Ala Arg Pro Val Ile Thr Val Asp Val Ser Ile
 1 5 10 15

Phe Leu

<210>11

<211>18

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>11

Arg His Tyr Val Ala His Val Lys Arg Arg Val Gln Asp Val Ile Ser
 1 5 10 15

Pro Ile

<210>12

<211>30

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>12

Glu Leu Pro Pro Leu Thr Pro Val Leu Arg Trp Lys Lys Gly Gln Lys
 1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Asn Gln Thr Val Phe Glu Arg Asn Cys Arg
 20 25 30

<210>13

<211>12

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>13

Tyr Leu Ala Leu Gly Ala Val Lys Asn Ile Ser Leu
 1 5 10

<210>14

<211>18

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>14

Cys Ser Val Gly Phe Pro Phe Met Arg Ser Lys Ser Lys Tyr Glu Phe
1 5 10 15
Ser Val

<210>15

<211>21

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>15

Ser Ser Ser Val Ile Gln Phe Met Ser Arg Ala Lys Val Lys Val Asp
1 5 10 15
Pro Ala Leu Arg Val
 20

<210>16

<211>5

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>16

Asp Tyr Asn Met Asp
1 5

<210>17

<211>5

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>17

Asp Tyr Tyr Met Tyr

1

5

<210>18

<211>5

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>18

Asp Thr Tyr Val His

1

5

<210>19

<211>5

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>19

Ser Tyr Gly Val His

1

5

<210>20

<211>17

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>20

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210>21

<211>17

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>21

Thr Ile Ser Asp Gly Gly Asn Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210>22

<211>17

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>22

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

<210>23

<211>16

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>23

Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser
 1 5 10 15

<210>24

<211>8

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>24

Ser Gly Val Ile Ser Thr Asp Tyr
 1 5

<210>25

<211>10

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>25

Asp Arg Asp Gly Ser Ser Leu Phe Ala Tyr
1 5 10

<210>26

<211>11

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>26

Trp Leu Arg His Phe Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210>27

<211>10

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>27

Asp Tyr Gly Asn Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210>28

<211>11

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>28

Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ile
1 5 10

<210>29

<211>11

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>29

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Ile Ala Val Ala
1 5 10

<210>30

<211>11

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>30

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

<210>31

<211>11

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>31

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210>32

<211>7

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>32

Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser
1 5

<210>33

<211>7

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>33

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210>34

<211>7

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>34

Asn Ala Asn Ser Leu Glu Asp
1 5

<210>35

<211>7

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>35

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210>36

<211>6

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>36

Tyr Ala Asn Tyr Pro Pro
1 5

<210>37

<211>6

<212>PRT

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			
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	160
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	240
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	320
Leu Leu Val Gly Ala Pro Met Phe Ser Glu Ile Arg Asp Glu Gly Gln			
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
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
625 630 635 640

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		
770	775	780
Gly Glu Ser Val Asp Ala Ala Asn Phe Ile Gln Leu Asp Asp Leu Glu		
785	790	795
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
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
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
 995 1000 1005
 Arg Arg Tyr Lys Glu Ile Ile Glu Ala Glu Lys Asn Arg Lys Glu
 1010 1015 1020
 Asn Glu Asp Ser Trp Asp Trp Val Gln Lys Asn Gln
 1025 1030 1035

<210>41

<211>5

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>41

Gly Tyr Gly Val Asn
 1 5

<210>42

<211>17

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>42

Met Ile Trp Gly Asp Gly Ile Thr Glu Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 Arg

<210>43

<211>10

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>43

Asp Ala Ser Ser Gly Tyr Gly Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210>44

<211>12

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>44

Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His

1 5 10

<210>45

<211>7

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210>46

<211>6

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>46

Tyr His Arg Ser Pro Tyr

1 5

抗人 $\alpha 9$ 整合蛋白抗体重链 CDR

	CDRH1	CDRH2
1K11 (H)	1:VQLQESGPELVKPGASVKIPCKASGYFTFD-YNMDWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTIY	59
21C5 (H)	1:VQLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFS-D-YMYWVFRQTPEKRLEWVATISDGGNYT-Y	58
24I11 (H)	1:VKLQESGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTY-VHVVVKQRPEQGLEWIGNIDPANGNTKY	59
25B6 (H)	1:VKLQQSGPLVAPSQSLSICTVSGFSLTIS-YGVHVVVRQPPGKGLEWLVIVWSGGSTN-Y	58
28S1 (H)	1:VKLQESGPELVAPSQSLSICTVSGFSLTICYGVN-VVRQPPGKGLEWLVGMWGDGI-TEY	58
1K11 (H)	60:NQKFQG-KATLLTVDKSSSTAYMELRLSLTSEDTAIYYCAH	112
21C5 (H)	59:YDPSVKGRFTISRDNAKNNLYLQMSLLKSEDTAMYYCAH	114
24I11 (H)	60:DPKFQG-KATITADTSSNTAYLHLSLTSSEDTAVIYYCAH	115
25B6 (H)	59:NSALM-SRLSISKDNFKSQVFLKMNSLQTDITAIYYCAH	113
28S1 (H)	59:NSALKSRLLSISKDNSKSVFLKMN-SLQTDITARIYYCAH	113
1K11 (H)	113:TVSS	116
21C5 (H)	115:TVSS	118
24I11 (H)	116:TVSS	119
25B6 (H)	114:TVS-	116
28S1 (H)	114:TVSS	117

图 1-1

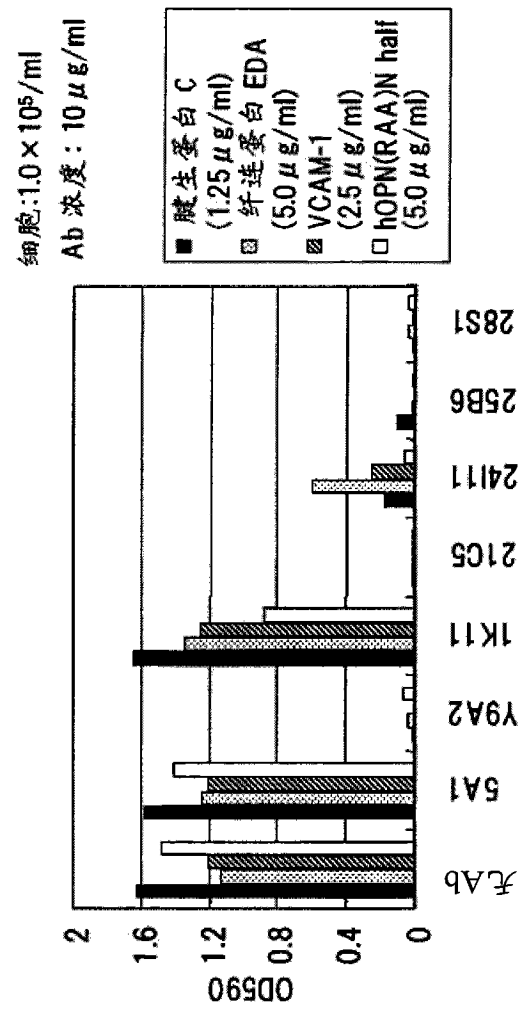


图 2

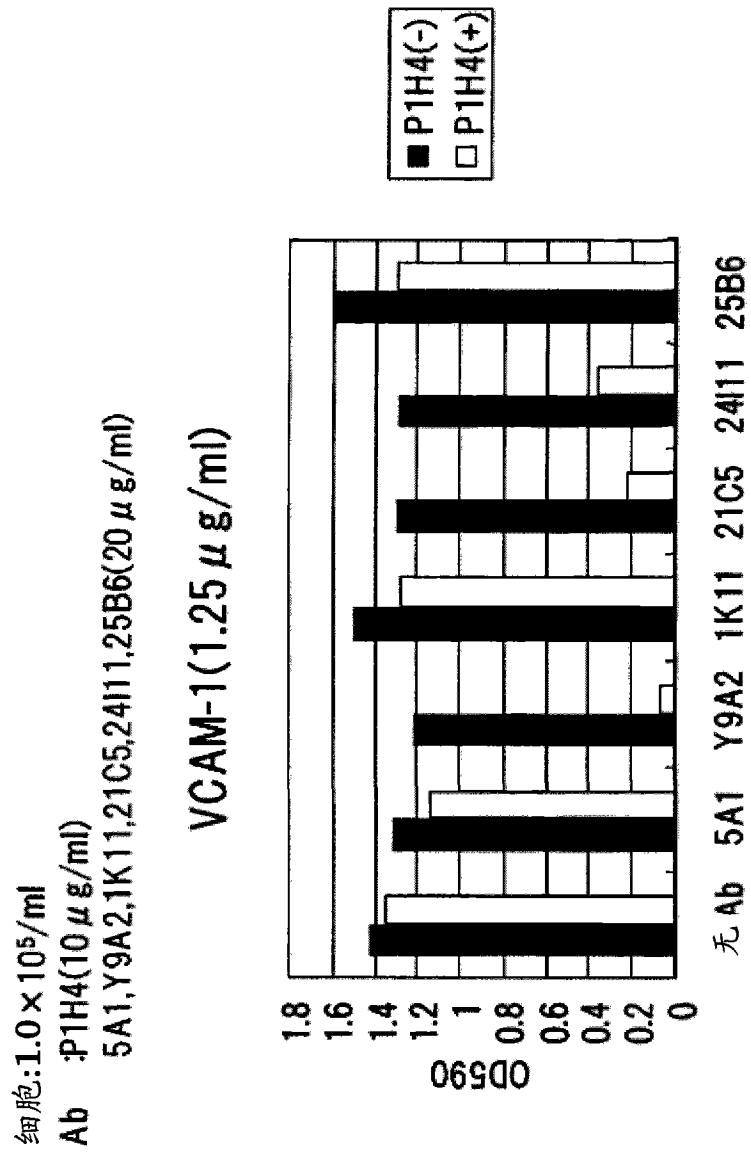


图 3

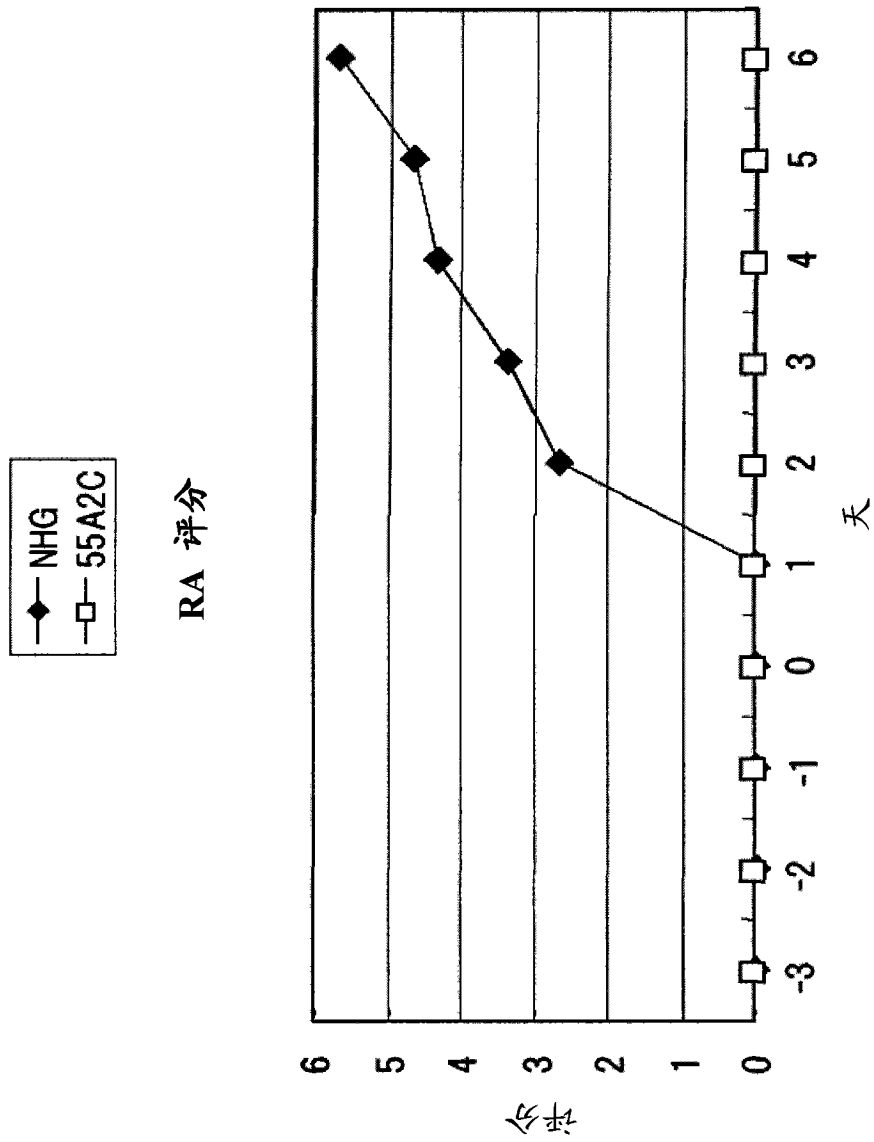


图 4

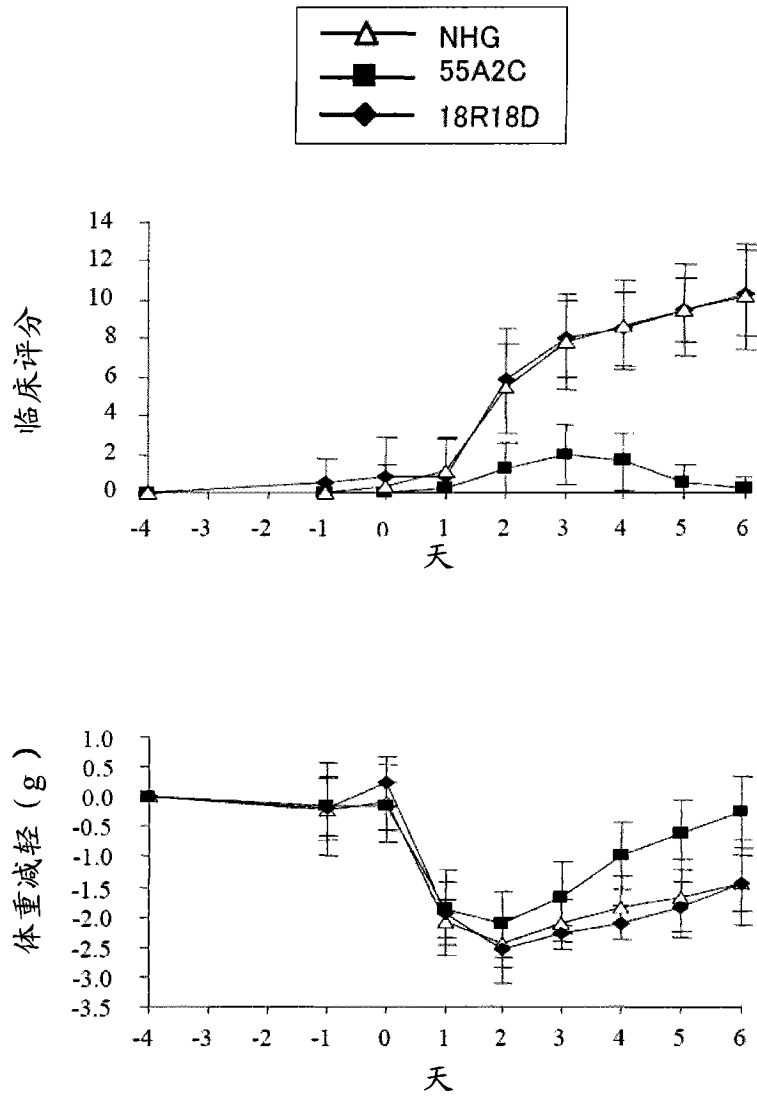


图 5

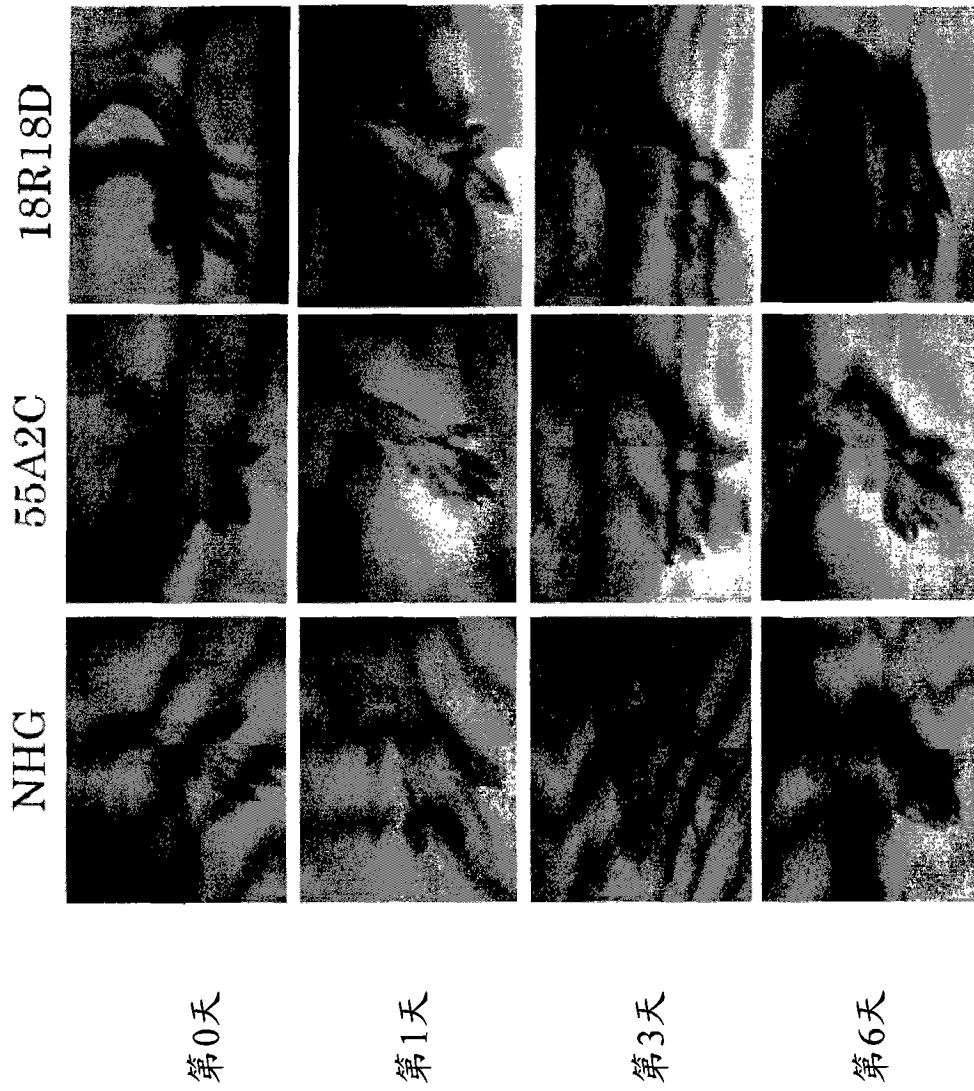


图 6

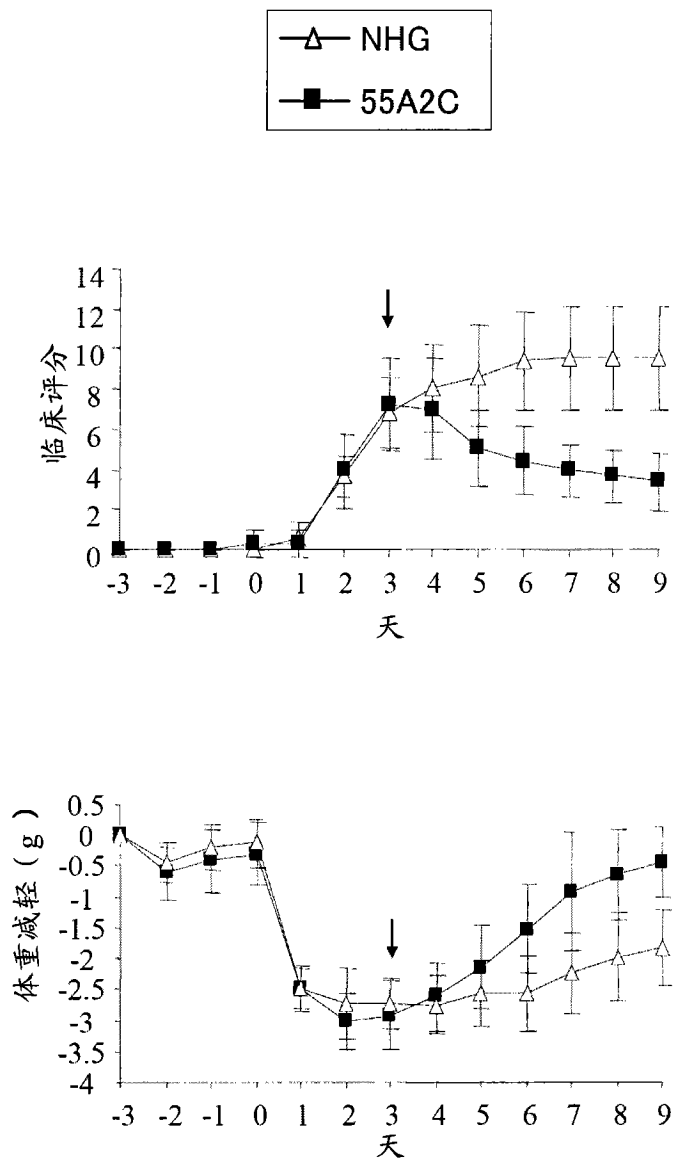


图 7

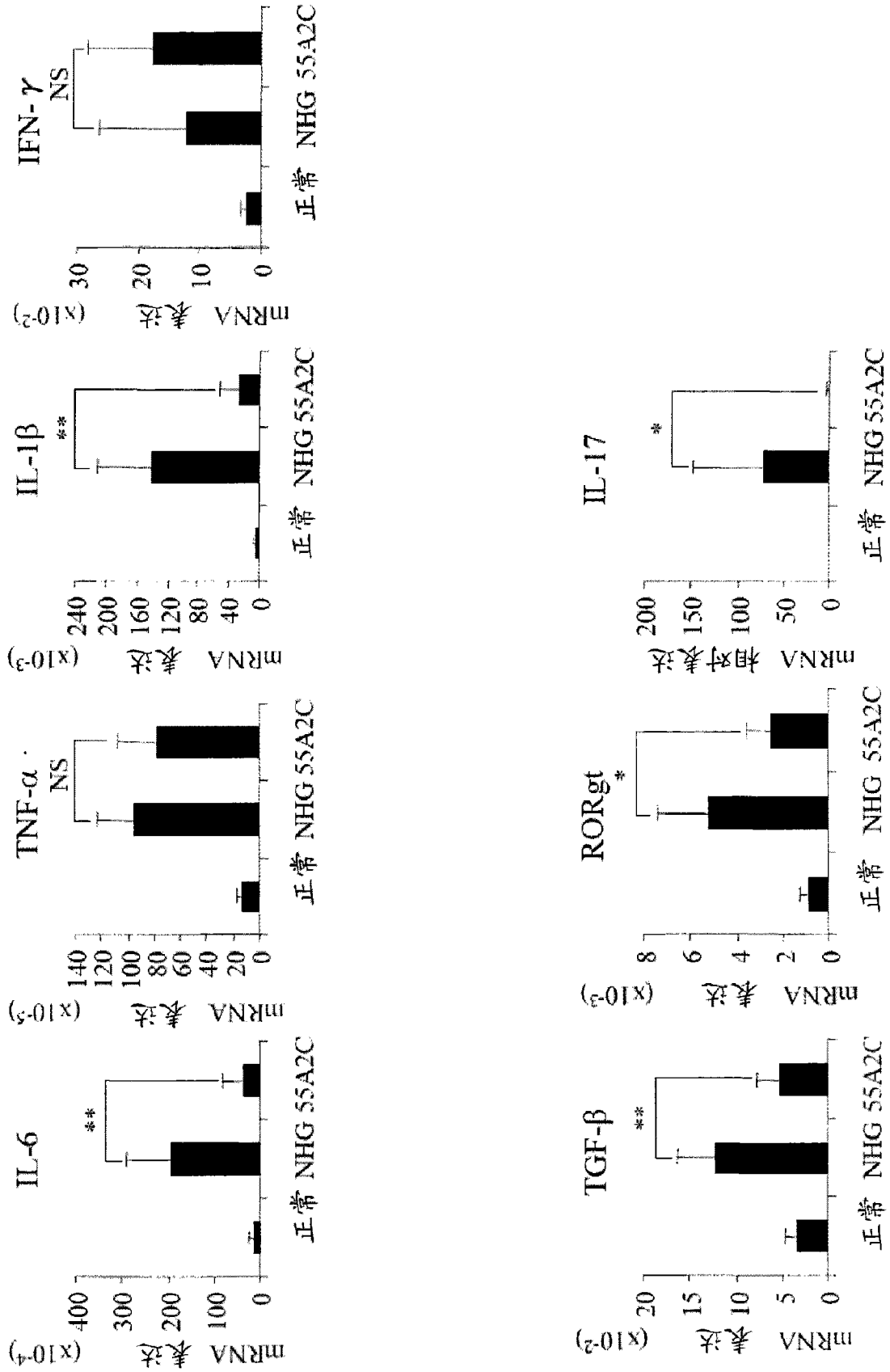


图 8

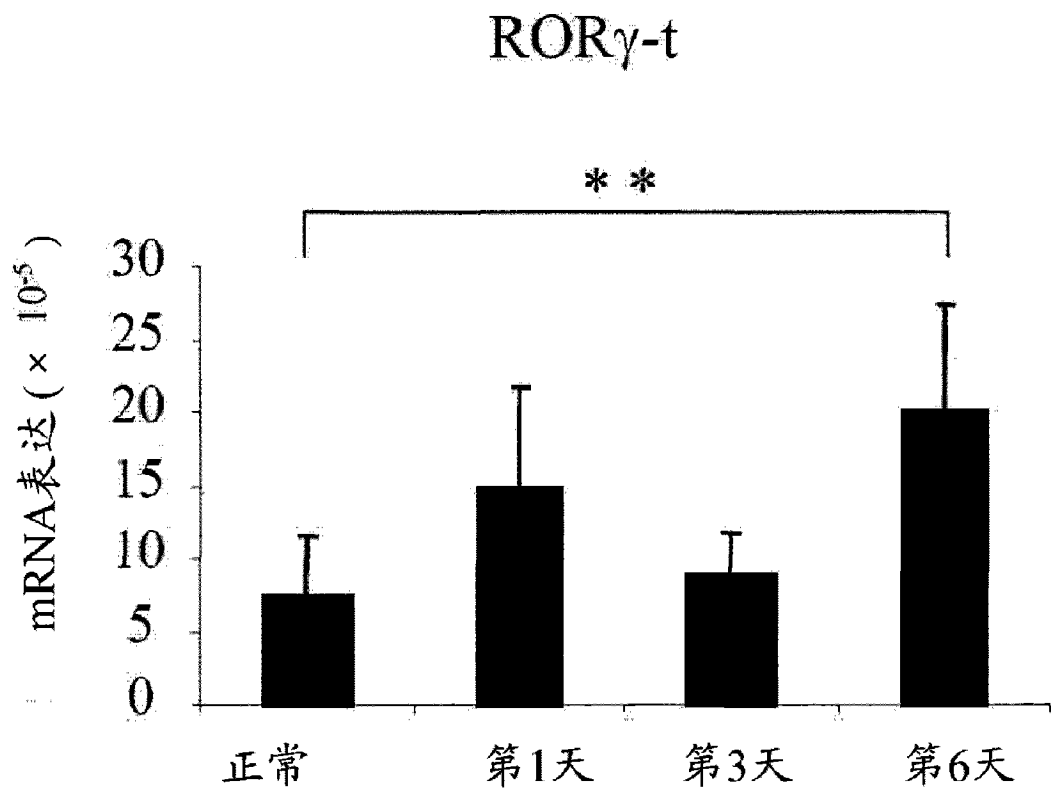
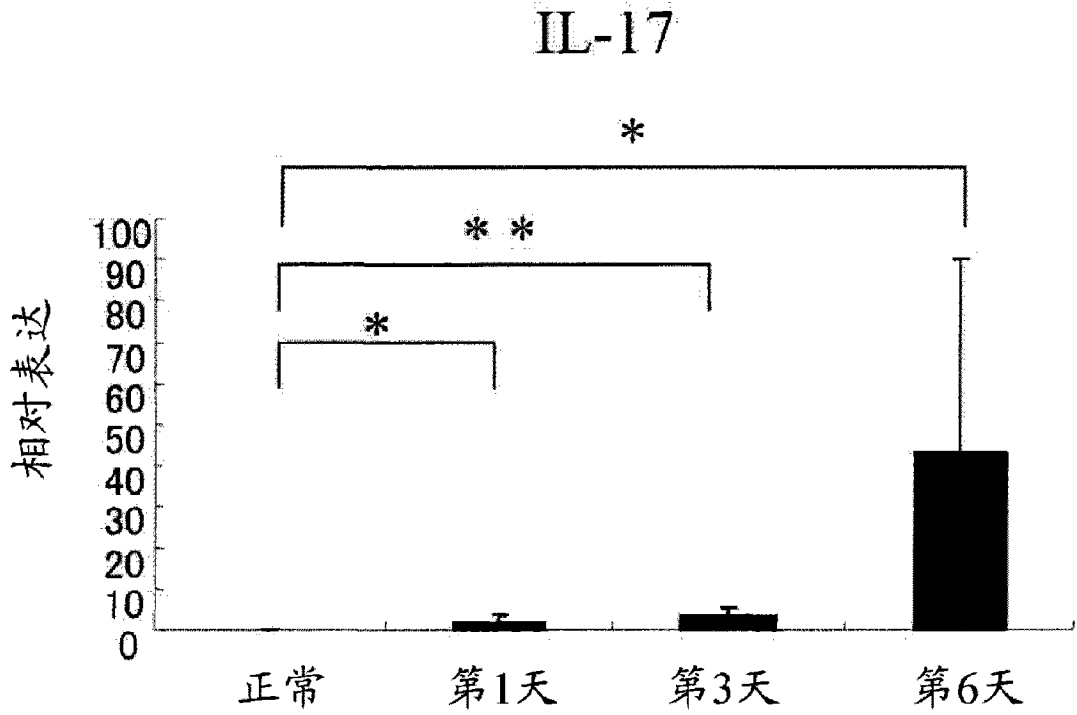


图 9

专利名称(译)	抗人α9整联蛋白抗体及其用途		
公开(公告)号	CN101506239B	公开(公告)日	2012-07-25
申请号	CN200780026209.3	申请日	2007-07-11
[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	金山刚士 黑滝大翼 今重之 上出利光		
发明人	金山刚士 黑滝大翼 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	C07K16/2839 C07K2317/34 C07K2317/565 G01N33/6872 G01N2333/70546 A61K2039/505 C07K2316 /96 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P11/06 A61P13/12 A61P19/00 A61P19/02 A61P19 /04 A61P19/08 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/06 C07K2317/76		
代理人(译)	刘新宇		
审查员(译)	王慧		
优先权	2006191836 2006-07-12 JP		
其他公开文献	CN101506239A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及特异性识别人α9整联蛋白的抗体(尤其是单克隆抗体)、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体;产生前述单克隆抗体的杂交瘤细胞;前述单克隆抗体的制备方法;前述杂交瘤细胞的制备方法;含有前述抗人α9整联蛋白抗体的治疗剂;含有前述抗人α9整联蛋白抗体的诊断试剂;抑制人α9整联蛋白的活性的化合物的筛选方法等。

抗人α9整联蛋白抗体重链 CDR

```

CDRH1
1K11(H) 1:VQLQDSGRLRFGSIVKFCASGCTFPYVHWKWSKSGSEKMDLHNWNGSTY 59
21C5(H) 1:VQLQDSGRLRFGSIVKFCASGCTFPYVHWKWSKSGSEKMDLHNWNGSTY 58
2411(H) 1:VQLQDSGRLRFGSIVKFCASGCTFPYVHWKWSKSGSEKMDLHNWNGSTY 59
25B6(H) 1:VQLQDSGRLRFGSIVKFCASGCTFPYVHWKWSKSGSEKMDLHNWNGSTY 58
28S1(H) 1:VQLQDSGRLRFGSIVKFCASGCTFPYVHWKWSKSGSEKMDLHNWNGSTY 58

CDRH2
1K11(H) 66:WRFQGLRMTYTKSSSFRWELNSLSDPDTVICH--SPTIST---DTRGGSTV 112
21C5(H) 59:FEISVRFPTISGDKRMLLWSSLSKSDPDTVICH--SPTIST---DTRGGSTV 114
2411(H) 66:DRFQGLRMTYTKSSSFRWELNSLSDPDTVICH--SPTIST---DTRGGSTV 115
25B6(H) 59:NSLALF--RSLISDMRISVFLKMSLSQDTPTVICH--SPTIST---DTRGGSTV 113
28S1(H) 59:NSLALF--RSLISDMRISVFLKMSLSQDTPTVICH--SPTIST---DTRGGSTV 113

1K11(H) 113:TWSS 116
21C5(H) 113:TWSS 116
2411(H) 116:TWSS 119
25B6(H) 114:TWSS 116
28S1(H) 114:TWSS 117

```